

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



**Interface Dentina/Cimento: AHPlus *versus* EndoSequence
BC Sealer/iRoot SP**

Susana Margarida Grossinho Dias

Dissertação de Investigação Científica

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2014/2015

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



**Interface Dentina/Cimento: AHPlus *versus* EndoSequence
BC Sealer/iRoot SP**

Susana Margarida Grossinho Dias

Dissertação de Investigação Científica

Orientadores

Prof. Doutor António Ginjeira

Prof.^a Doutora Manuela Lopes

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2014/2015

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Doutor António Ginjeira e à Prof.^a Doutora Manuela Lopes, pela inestimável orientação pessoal, confiança e incentivo; pela incomensurável qualidade e formação científica; e pelo precioso tempo que dedicaram a esta dissertação.

Agradeço à Dra. Isabel Vasconcelos, minha estimada colega, com incansável contributo e partilha de saber.

Agradeço aos professores, Dr. Diogo Guerreiro, Dr. Rui Pereira da Costa, Dra. Claudia Martins, Dr. Pedro Cruz, Dr. Henriques Luis e Dr. Mário Rito, pelo acompanhamento e contributo.

Aos meus colegas, Dra. Magali Guerreiro e Dr. Telmo Galvão, pela amizade e camaradagem ao longo deste percurso.

À Maria Eugénia e Israel Dias, meus pais, pelo contínuo e indispensável apoio e motivação.

Ao Francisco, pelo tempo dispensado e apoio incondicional, que só ele me poderia ter dado.

Lisboa, 16 de Junho de 2014

Índice Geral

1. Introdução.....	7
2. Revisão de Literatura.....	8
2.1.Cimentos Endodônticos Resinosos e biocerâmicos.....	8
2.1.1. AHPlus	9
2.1.2. Características	9
2.1.3. EndoSequence BC Sealer/iRoot	13
2.2.Nitrato de prata e nanoinfiltração.....	19
3. Metodologia de Estudo.....	22
3.1.Objectivos.....	22
3.2.Materiais e Métodos.....	23
3.2.1. Selecção dos dentes.....	23
3.2.2. Preparação e obturação canalar das amostras.....	25
3.2.3. Técnica laboratorial para protocolo de nanoinfiltração com nitrato de prata.....	25
3.2.4. Preparação das amostras para o MEV de electrões retrodifundidos.....	26
4. Avaliação da adaptação e Análise Estatística.....	27
5. Resultados.....	28
6. Discussão.....	30
7. Conclusões.....	38
8. Referências Bibliográficas.....	39
9. Apêndices	
1. Tabelas, Quadros, figuras e instruções do fabricante: EndoSequence BC Sealer/AHPlus	
2. Materiais e métodos	
3. Imagens de MEV de EndoSequence BC Sealer/AHPlus	
4. Imagens de MEV	
5. Estatística	
6. Índice de Abreviaturas	

Resumo

Objectivo: O presente estudo teve como objectivo avaliar a adaptação marginal de dois cimentos, AHPlus e Endosequence BC Sealer/iRoot.

Metodologia: Seleccionaram-se 26 dentes que foram preparados com o sistema Protaper Universal e irrigados com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 5,25%, aplicando o protocolo de irrigação final com ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) a 17%. Seguidamente foram separados dois dentes para o grupo controlo e os restantes vinte e quatro divididos em dois grupos nos quais doze dentes foram obturados com AHPlus/Gutta-Percha (AHP/GP) e os outros doze dentes com EndoSequence BC Sealer/Gutta-Percha (ES/GP) pela técnica de compactação vertical de onda contínua. Os dentes foram envernizados com duas camadas de verniz excepto na zona coronária a sensivelmente 1-2mm do canal radicular e depois imersos numa solução de Nitrato de Prata (NP) durante 24h. Após este procedimento os dentes foram seccionados perpendicularmente em discos com 2mm de espessura, divididos por terços (apical, médio e coronário com dois discos por terço), fixados e polidos. A adaptação marginal foi avaliada através da identificação de depósitos de prata com microscopia electrónica de varredura (MEV) de electrões retrodifundidos.

As imagens foram avaliadas na sua extensão ao longo de 360°. Os discos foram divididos em 4 quadrantes para a realização de uma leitura dicotómica por quadrante, sendo que cada disco teve 4 leituras quanto à presença ou ausência de NP.

Foi utilizado o Microsoft Office Powerpoint 2007, de forma a montar imagens a 250x de todo o perímetro da interface dentina/cimento da amostra, tendo como referência dos limites dos quadrantes uma ampliação menor de forma a identificar referências à medida que se avança na leitura.

Análise estatística: Foram aplicados o teste Qui-quadrado na comparação dos dois grupos e testes não paramétricos na comparação dos terços radiculares. O software utilizado foi o SPSS 16.0 para Windows (SPSS, Chicago, USA)

Resultados: Comparando os dois grupos em estudo relativamente à presença de maior infiltração, ou seja, qual o grupo que infiltrou mais, aplicando o teste de Qui-quadrado, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($P > .05$).

Especificamente dentro de cada grupo, na correlação entre os terços com testes não-paramétricos, não foi encontrada correlação entre as infiltrações entre os três terços do grupo AHPlus (AHP) ($P>.05$), mas no grupo Endosequence BC Sealer/iRoot SP (ES), houve diferenças estatisticamente significativas entre seus terços ($P<.001$). Comparando os terços do grupo ES o terço coronário infiltrou mais do que o apical e, também, mais do que o terço médio. Entre o terço médio e apical não houve diferenças. Comparando os terços entre os dois grupos AHP e ES, no terço apical e coronário não houve diferenças entre os grupos ($P=.7$) e ($P=.8$), no terço médio houve diferenças estatisticamente significativas, tendo o grupo AHP registado mais infiltração do que o grupo ES ($P<.01$).

Conclusões: Ambos os cimentos registaram em algumas zonas da interface dentina/cimento depósitos de grãos de prata, embora não tenham sido registadas diferenças estatisticamente significativas entre o total de infiltrações dos dois cimentos. Na análise dos terços radiculares dentro do grupo do EndoSequence, o terço coronário apresentou pior adaptação marginal comparativamente aos terços médio e apical, todavia o EndoSequence registou melhor capacidade de adaptação no terço médio comparativamente ao AHPlus.

Em conclusão, comparando os dois cimentos endodônticos, poder-se-á aferir que a capacidade de adaptação dos cimentos foi equivalente, no entanto, o EndoSequence revelou melhor adaptação marginal no terço médio.

Será necessária mais investigação no âmbito da obturação endodôntica através de infiltração por meio de nitrato de prata, e também no sentido de avaliar a capacidade de selagem e o comportamento do cimento biocerâmico EndoSequence BC Sealer/iRoot SP relativamente a outros cimentos.

Palavras-chave: electrões retro-difundidos; interface dentina/cimento; cimento endodôntico biocerâmico; nano-infiltração; nitrato de prata.

ABSTRACT

Aim The present study was designed to evaluate adaptation of the dentin/sealer interface between two sealers, AHPlus and EndoSequence BC Sealer/iRoot SP.

Methodology Twenty-six single-rooted extracted human teeth were prepared using a crown-down technique with Protaper Universal rotary files, irrigated with 5,25% NaOCl and 17% EDTA, and obturated with either AH-Plus/GP or EndoSequence/GP. The present microscopic study examined the dentin/sealer interface using a silver nitrate staining technique. The teeth were sectioned perpendicularly to the long axis to obtain one-hundred and four 2mm thick dentin discs. They were examined for gap silver-containing regions along the disc walls by detecting presence or absence of silver nitrate in apical, medium and coronal thirds under back-scattered field emission gun scanning electron microscopy (FEG-SEM). Data were recorded and analysed using computer Windows software SPSS 16.0, (SPSS, Chicago, USA).

The samples were observed in 360° using Microsoft Office Powerpoint 2007, by dividing the images (250x) in four quadrants, for a dicotomic analysis per quadrant (presence/absence of silver), with reference of the limits of the quadrants using a lower magnification. Each sample had four readings.

Statistical analysis was performed using Chi-Square and nonparametric methods ($P < .05$).

Results: SEM revealed gap silver-containing regions in both sealers.

There was no significant difference between the two root filling materials ($p > .05$). However, comparing the apical, middle and coronal thirds there was a significant difference at the medium third between the two sealers ($P > .005$). AHPlus/gutta-percha showed a significantly higher amount of gap silver-containing regions. Additionally, for sealers alone, EndoSequence BC Sealer showed a statistical difference in the coronal third regarding both apical and medium thirds, with higher amount of gap silver-containing regions ($P < .001$).

Conclusions: Both sealers showed gap silver-containing deposits, consequently complete hermetic seal could not be achieved with either material. It may be concluded that they have

equivalent sealing abilities, however EndoSequence BC Sealer showed a superior interface adaptation in the medium third than AHPlus.

Further studies should be performed to clarify the sealing ability and clinical performance of this new bioceramic material.

Keywords: back-scattered electrons; dentin/sealer interface; root filling materials; bioceramic sealer; nanoleakage; silver nitrate.

1 Introdução:

A obturação canalar tem como objectivo principal selar tridimensionalmente o sistema de canais, de forma a impedir a reinfecção por meio de micro-organismos e sua perpetuação. Esta fase do tratamento endodôntico adquire especial relevância, uma vez que o sistema de canais radiculares é muitas vezes complexo e de difícil acesso dificultando as fases iniciais de modelagem e desinfecção mecânica e química. Segundo Cohen, 2007 e De Deus, 1992, a obturação dos canais radiculares deve ser realizada de forma a preencher completamente todo o sistema de canais com materiais inertes e assépticos que tenham a capacidade de promover uma selagem hermética com intenção de impedir a circulação de exsudado periapical, de micro-organismos e seus produtos e promover, assim a cicatrização dos tecidos periapicais.

Vários tipos de materiais endodônticos têm vindo a ser estudados no âmbito da obturação canalar, sendo o material de eleição a Gutta-Percha, mas independentemente do tipo de cone ou técnica de obturação aplicada, o uso de um cimento endodôntico adquire especial relevância, pois permite o preenchimento de lacunas vazias deixados pela contracção pós-arrefecimento da GP permitindo obter uma obturação tridimensional e biologicamente compatível, satisfazendo desta forma os requisitos de uma obturação canalar com vista a um sucesso a longo prazo.

Em suma, o cimento endodôntico tem como objectivo principal ocupar os espaços vazios deixados pela GP durante a obturação, adquirindo também um papel coadjuvante na biocompatibilidade e na adesão da GP às paredes do canal e entre si (Cohen, 2007).

Existem no mercado actualmente vários tipos de cimentos, com formulações diferentes e consequentemente comportamentos diferentes. Nesta dissertação serão abordados e comparados dois tipos de cimentos endodônticos relativamente às suas capacidades de selagem, o AHPlus® da DENTSPLY DeTrey GmbH, Konstanz, Germany de características resinosas e um cimento biocerâmico relativamente novo no mercado o Endosequence BC Sealer® da Brasseler, Savannah, GA /iRoot SP® (Innovative Bioceramix, Vancouver, Canadá).

A metodologia de infiltração utilizada foi a nanoinfiltração por meio de NP e visualização ao MEV de electrões retrodifundidos, de forma a identificar a depósitos de NP nas lacunas deixadas pela obturação na interface dentina/cimento.

Existem poucos trabalhos de investigação que comparem estes dois cimentos endodônticos com o método de nanoinfiltração com NP. O protocolo de nanoinfiltração é pouco vulgar em estudos de obturação endodônticos e a sua aplicação é preferencial nas áreas da Dentisteria Operatória e Prostodontia Fixa. Esta metodologia surge primeiramente na investigação da presença de nanoporos abaixo da camada híbrida de resinas compostas impulsionada a partir dos anos 90 por Sano *et al.*, 1994, sendo largamente aplicada nesta área durante essa década. A evidência de um excelente contributo para a investigação da capacidade de selagem de materiais restauradores despertou o interesse da comunidade endodôntica no sentido de aplicar este método de infiltração aos estudos de materiais de obturação. Com efeito, apesar de ser um protocolo bastante estudado em outras áreas da Medicina Dentária a sua aplicação na Endodontia é relativamente recente, tendo vindo a aprimorar-se, a crescer e a merecer cada vez mais o interesse da comunidade endodôntica.

2 Revisão de Literatura:

2.1 Cimentos endodônticos resinosos e biocerâmicos: AHPlus e Endosequence BC Sealer/iRoot SP:

Na endodontia, diversos estudos tem vindo a pesquisar e a desenvolver cimentos de obturação com boas propriedades físicas e químicas, que não promovam irritabilidade dos tecidos periapicais, ou seja, com o objectivo de cumprir os requisitos de Grossman. Autor que em 1988, complementou as propriedades importantes de um cimento endodôntico, já citadas por si, em 1958 e complementadas também mais tarde por outros autores como Ingle, 1994; Cohen, 1994, 2007.

Crítérios de Grossman:

- a. Ser homogéneo - boa adesividade
- b. Promover uma selagem hermética
- c. Ser radiopaco
- d. As partículas do pó devem ser finas para se misturarem bem com o líquido
- e. Não deve sofrer contracção após presa
- f. Não deve manchar a superfície dentária
- g. Ser bacteriostático / impedir crescimento microbiano

- h. Ter tempo de presa e trabalho
- i. Ser insolúvel nos tecidos periapicais
- j. Ser biocompatível/não causar irritação/não sofrer corrosão
- k. Ser fácil de remover do sistema de canais
- l. Não deve provocar reacções inflamatórias imunitárias quando em contacto com os tecidos periapicais
- m. Não deve ser mutagénico nem carcinogénico

Actualmente, existem diversos tipos de cimentos endodônticos, a escolha de um cimento adequado adquire relevância, pois em conjunto com todos os outros passos que compõem todo o tratamento endodôntico irá contribuir no sucesso do tratamento endodôntico, e por isso as suas propriedades seladoras, físicas e químicas têm vindo a ser desenvolvidas e melhoradas ao longo dos tempos (Apêndice 1, Tabela 1).

Os cimentos resinosos têm vindo a ser destacados na literatura devido às suas vantagens quanto ao tempo de presa, tempo de trabalho, adesividade, biocompatibilidade e capacidade de selagem, desta forma, os trabalhos de investigação têm vindo a evoluir no sentido de melhorar as propriedades deste tipo de cimentos, resultando no surgimento do AHPlus® da DENTSPLY DeTrey GmbH, Konstanz, Germany, sucessor do AH 26® também da Dentsply.

O AH 26 DENTSPLY DeTrey GmbH, Konstanz, Germany é um cimento tipo resina epóxi de libertação lenta, no qual há libertação de formaldeído durante a presa, sendo considerado um cimento com propriedades irritantes (Spånberg *et al.*, 1993).

2.1.1 AHPlus® (DENTSPLY DeTrey GmbH, Konstanz, Germany):

(Apêndice 1, figura 1)

2.1.2 **Composição da pasta a e pasta B do cimento** (Apêndice 1, tabela 1)

Características/vantagens do AHP, segundo o fabricante (Apêndice 1, tabela 2)

Instruções do fabricante (Apêndice 1, figura 7)

O AHP é um cimento á base de resina epóxi, desenvolvido pela Dentsply também conhecido como Topseal® (com este nome é comercializado nos EUA), apresenta-se em relação ao seu precursor com muito menor libertação de formaldeído com boas propriedades

físicas, químicas e de selagem, baixa solubilidade e desintegração (Schafer *et al.*, 2003) boa adesividade (Eldeniz *et al.*, 2005), boas propriedades anti-microbianas e biológicas (Leyhausen *et al.*, 1999; Azar *et al.*, 2000) e adequada capacidade de selagem marginal (DeMoor *et al.*, 2004). Foi desenvolvido a partir do cimento AH 26, ao qual foram introduzidas algumas modificações nomeadamente nas características de biocompatibilidade (Leonardo *et al.*, 1999), assim como de estabilidade dimensional/volume, radiopacidade, resistência, escoamento, adesividade e solubilidade. Estas características foram melhoradas dando origem ao AHP composto por duas pastas. Algumas investigações consideram que estes dois cimentos possuem características de selagem marginal equivalentes (DeMoor *et al.*, 2004).

A libertação de formaldeído é considerada um factor irritante dos tecidos biológicos que induz toxicidade e por esse motivo muitos cimentos endodônticos têm vindo a ser testados quanto a essa propriedade desvantajosa. É sabido que alguns cimentos endodônticos apresentam efectivamente na sua composição a molécula de formaldeído/paraformaldeído, citando particularmente o N2 da Agsa e a Endometasona® da Septodont como exemplos, em contraste com outros cimentos que não apresentam essa substância na sua composição mas, no entanto, durante o processo de presa essa substância pode realmente formar-se e ser libertada nos tecidos periapicais actuando como agente irritante e tóxico. Alguns investigadores demonstraram que o AH 26 apresenta efectivamente libertação de formaldeído durante a presa, molécula que se forma pela reacção química que ocorre entre a resina-bisfenol A e a molécula de hexametenatetramina, Spånberg *et al.*, 1993 observou, contudo que a quantidade maior de formaldeído libertada ocorre nas primeiras 48h. Esta propriedade é referida pelo fabricante como inexistente nas formulações melhoradas dos cimentos de resina como o AHP e o Topseal. Em 1999, Leonardo e Tanomaru Filho *et al.*, testaram 4 cimentos na procura de presença e quantidade ou ausência deste fenómeno em 4 cimentos diferentes testando o AHP, AH 26, Endometasona e o Topseal. Após presa destes materiais a avaliação da libertação de formaldeído foi constatada por espectrometria/infra-vermelhos. Todos os materiais testados libertaram formaldeído, tendo o AH 26 e a Endometasona registado concentrações maiores do que os cimentos AHP e Topseal que libertaram também a mesma substância, mas em concentrações bastante inferiores consideradas pelos autores “quantidades mínimas”.

No que se refere a outros parâmetros das características destes cimentos, alguns estudos evidenciam que o AHP apresenta superioridade na resistência à infiltração. Um estudo de Zemner *et al.*, 1997 visou comparar a capacidade de infiltração com aplicação de corante (azul de metileno) do AHP e AH 26, em 3 tempos: 2, 4 e 10 dias, utilizando 72 dentes com um só canal após fractura vertical, observaram através de estereomicroscópio que a profundidade de infiltração era proporcional ao tempo de imersão. Ambos os grupos apresentaram infiltração mas o AHP foi cimento que demonstrou menor infiltração em concordância com outros trabalhos (Neelakantan *et al.*, 2011), que demonstraram também que o AHP possui boas propriedades de selagem.

Comparativamente com os cimentos biocerâmicos, Zhang *et al.*, 2009a, comparou o AHP e um cimento biocerâmico o iRoot SP (equivalente ao ES) relativamente à infiltração apical e técnica de obturação canalar, em que foram utilizados 68 dentes unirradiculares, instrumentados com Protaper Universal, obturados também com Protaper pela técnica de compactação vertical de onda contínua (TCVOC) e pela técnica de cone único (TCU). Grupo A: iRoot SP/TCVOC/cone F3 Protaper, Grupo B: iRoot SP/TCU/cone Protaper F3, Grupo C: AHP/TCVOC/cone F3 Protaper. A infiltração foi testada com o método de penetração de fluidos durante diferentes períodos de tempo e a avaliação das amostras foi observada ao MEV após fractura longitudinal das raízes. Os autores concluíram existirem falhas na interface dentina-obturação com mais evidência para o grupo do AHP mas sem diferenças estatisticamente significativas, o grupo que registou maior infiltração foi o grupo B (iRoot SP/TCU), no entanto, sem valor estatisticamente significativo e por isso, os autores concluíram que a TCU/iRoot SP/ES é equivalente à TCVOC/AHP, e também à mesma técnica de obturação com iRoot SP/ES.

Relativamente a outros cimentos resinosos, o AHP/GP foi comparado com o EndoRez/Active GP e o Resilon/Epiphany com o intuito de avaliar a microinfiltração com um sistema de infiltração de glicose e observação da infiltração durante 3 semanas, a capacidade de infiltração foi avaliada quantitativamente e semanalmente pelo sistema *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Não foram observadas diferenças entre os grupos.

Em relação à capacidade de adesão do AHP, De Deus *et al.*, 2009, conduziu um dos seus trabalhos com a finalidade de comparar o Epiphany SE e Epiphany tendo o AHP como referência, quanto à sua capacidade de adesão à dentina. Os três grupos tinham 12 amostras cada, foram preparados e obturados com GP e após esses procedimentos foram seccionados

horizontalmente em 4 partes a 1mm do ápex. Foi aplicado neste estudo o teste de *Push-Out* com aplicação de uma carga de 0,5mm/min. Após a fractura do material a carga era registada em Megapascals (MPa), concluindo-se que a obturação GP/AHP demonstrou melhor adesão à dentina do que os outros dois materiais, grupos que entre si não demonstraram diferenças significativas. Em 2011, De Deus *et al.*, comparou novamente estes 3 cimentos, mas neste trabalho foi avaliada a adaptação marginal com microscopia confocal, tendo sido utilizados 36 caninos superiores divididos em 3 grupos com 12 amostras cada, com as amostras preparadas, obturadas e seccionadas a 1mm do ápex e aos 3, 6 e 8 mm. A interface dentina cimento foi avaliada quanto à presença e tamanho das lacunas ao longo da obturação canalar. Foi concluído que o grupo com menos lacunas e de menor dimensão foi o grupo do AHP, tendo-se concluído que o AHP apresentou boa capacidade de selagem.

Em relação ao escoamento, propriedade com muita importância no comportamento de um cimento, uma vez que o escoamento determina a capacidade maior ou menor de um cimento penetrar e ocupar lacunas nas reentrâncias mais complexas do sistema de canais, zonas onde muitas vezes os irrigantes e os instrumentos mecânicos têm dificuldade em chegar. Siqueira *et al.* 2000, desenvolveu um trabalho de investigação onde testou a capacidade de escoamento de 6 cimentos, e também a sua capacidade antimicrobiana. Foram testados os seguintes cimentos endodônticos: AHP, ThermoSeal, Sealer Plus, cimento de Grossman, Sealer 26 e Pulp Canal Sealer EWT, para o teste antimicrobiano foi usado o teste de difusão de agar com amostras de saliva, colónias de bactérias anaeróbias estritas, facultativas e colónias aeróbias, para o teste de escoamento, os cimentos foram preparados, segundo as indicações do fabricante, espatulados em placa de vidro, sendo depois colocada sobre os cimentos uma outra placa de vidro e 500g de peso por um minuto. Em termos de capacidade antimicrobiana, todos os cimentos demonstraram ter essa capacidade, quanto ao escoamento os cimentos com melhores resultados foram o AHP e o Pulp Canal Sealer EWT da Kerr.

Versiani *et al.*, 2006, realizou um trabalho em que comparou algumas propriedades físico-químicas dos cimentos AHP e Epiphany. As propriedades avaliadas foram: escoamento, estabilidade dimensional, solubilidade, tempo de presa, e espessura do cimento. O AHP manteve as suas propriedades dentro das especificações padrão e demonstrou ser superior em relação ao Epiphany nos parâmetros solubilidade, estabilidade dimensional e equivalente nos parâmetros escoamento e espessura.

Relativamente a estudos com nanoinfiltração relacionados com selagem, Tay *et al.*, 2005, avaliou a qualidade ultraestrutural da selagem apical de obturações endodônticas com técnica de TCVOOC com dois grupos: AHP/GP e Epiphany/Resilon. O objectivo foi comparar através da nanoinfiltração com NP e observação ao MEV e microscópio electrónico de transmissão (MET), a qualidade da selagem apical entre dois materiais de obturação aplicados com a mesma técnica de obturação. Utilizando dentes unirradiculares, o protocolo incluiu os passos descritos por Sano *et al.*, 1995, com a imersão das amostras após obturação durante 24h em NP (37° C e 100% de humidade), seguida da imersão em solução reveladora e luz fluorescente durante 8h. As raízes foram depois fracturadas verticalmente para serem avaliadas na identificação de lacunas ao longo da obturação. O resultado revelou nos dois grupos infiltração nos 3mm apicais. A observação ao MEV revelou lacunas não preenchidos por material de obturação nos dois grupos ao longo das obturações, foram também observadas zonas com *tags* de resina no grupo Resilon/Epiphany em zonas onde se observou selagem entre a dentina e o canal, e também se observaram frequentemente separações entre a GP e o AHP. A observação ao MET revelou depósitos de prata entre a camada híbrida e o cimento no grupo Resilon/Epiphany, e também depósitos de prata no grupo GP/AHP. Foi concluído não existir selagem hermética completa em nenhum dos dois grupos, e não existir igualmente superioridade na selagem dos canais com o sistema conhecido como sistema “Monobloco” Resilon/Epiphany relativamente á GP/AHP, uma vez que o primeiro forma uma adesão química à dentina.

2.1.3 EndoSequence/iRoot SP:

(Apêndice 1, Figura 2)

Componentes:

- Óxido de zircónia
- Silicato de cálcio
- Fosfato de cálcio mono-básico
- Hidróxido de cálcio
- Agentes Radiopacificadores e espessantes

Características do produto: (Apêndice 1, quadro 1)

Instruções do fabricante: (Apêndice 1, figura 8)

Descrição do produto:

- a. Cimento apresentado em seringa Pré-misturado e pronto a ser aplicado.
- b. Insolúvel, radiopaco e sem alumínio, composto por silicato de cálcio requerendo a presença de moléculas de água para tomar presa.
- c. Sem contração durante a presa com excelentes características físicas

Indicações de uso:

- i. Obturação de canais em casos vitais
- ii. Obturação de canais em casos não vitais e entre sessões de medicação intracanal
- iii. Adequado para técnicas de obturação a frio: cone único e condensação lateral.

Tempo de trabalho:

- i. Não necessita de mistura
- ii. Pode ser aplicado directamente dentro do canal
- iii. Tempo de trabalho: 4h à temperatura ambiente

Tempo de presa:

- i. De acordo com as normas ISO 6876:2011: mais do que 4h
- ii. Em canais muito secos/desidratados o tempo de presa pode ultrapassar as 10h.

A procura de materiais cada vez mais perfeitos ou ideais é uma constante presente em todas as áreas da Medicina Dentária. O sucesso de um tratamento endodôntico não depende apenas das características dos materiais utilizados na fase de obturação, mas também de todas as outras fases incluídas num tratamento desde o primeiro momento. Desta forma, a investigação no que diz respeito aos cimentos endodônticos tem proporcionado à comunidade endodôntica uma vasta panóplia de cimentos com diferentes características, na procura de um cimento com características ideais como já referido. Os cimentos biocerâmicos são uma das mais recentes inovações no campo dos cimentos endodônticos, de que é exemplo o EndoSequence BC Sealer da Brasseler, USA, também comercializado no Canadá com o nome de i Root SP da Innovative BioCeramix Inc, Vancouver, Canadá. O ES é um cimento branco

e inovador, pré-misturado, fácil de usar, composto por nanopartículas biocerâmicas, biocompatível, sem alumínio, muito radiopaco e insolúvel, criado para ser utilizado em obturação ortrógrada. A formulação deste novo material tem como base as características dos materiais de obturação retrógrada como cimentos do tipo *Mineral Trioxide Aggregate* (MTA)/*Bioaggregate*. Especificamente encontram-se presentes na sua composição os silicatos, como o silicato de cálcio, o óxido de zircônia, o fosfato de cálcio e o hidróxido de cálcio. Com efeito, a capacidade de osteogênese e osteocondução dos cimentos do tipo MTA foi adaptada aos cimentos biocerâmicos, de forma a obter com o mesmo princípio, a mesma finalidade terapêutica, a de selar o sistema de canais com formação de tecidos periapicais e promoção de cicatrização através de uma ligação química aos componentes biológicos apicais.

A adesividade é uma característica destacada na sua formulação, e é consequente da sua capacidade de estabelecer ligações químicas às paredes do canal através da formação de hidroxiapatite e não da presença de monómeros de resina como é o caso de cimentos resinosos do tipo Resilon/Epiphany e AHP. Esta capacidade de formar hidroxiapatite durante o processo de presa permite uma forte adesão entre a dentina e a obturação, em suma presume-se que terá uma capacidade de selagem excelente comparativamente a outros cimentos endodônticos (Koch *et al.*, 2009). O ES sendo um cimento hidrofílico durante a fase de presa, o hidróxido de cálcio presente na sua composição reage com os iões de fosfato formando hidroxiapatite e moléculas de água. Estas moléculas de água continuam a reagir com o silicato de cálcio formando um precipitado *gel-like* de silicato de cálcio hidratado. A água presente na reacção é fundamental para controlar a hidratação e a presa do cimento (Koch *et al.*, 2009) (Apêndice 1, figura 4). Desta forma, utiliza a água naturalmente presente nos túbulos dentinários para reagir e iniciar a presa do material, reduzindo o tempo de presa. Uma vez que a dentina é composta por 20% de água (em volume) é utilizada durante a interacção para formar hidroxiapatite (Koch *et al.*, 2009) (Apêndice 1, figura 5).

No estudo de Zhang. *et al.*, 2009a, já referido, os autores concluíram que não existiram diferenças entre os grupos de obturação, possíveis razões apontadas prenderam-se com a formulação inovadora do cimento biocerâmico, ausência de contracção do cimento biocerâmico e a suas características similares ao MTA. Essas partículas têm capacidades osteogénicas/osteocondutoras de forma a induzir formação de tecido ósseo, característica útil em casos de periodontite apical em que existe uma perda de estrutura óssea devido á presença

de micro-organismos (Kossev *et al.*, 2009). Oferece excelente biocompatibilidade com reduzida reacção inflamatória por parte dos tecidos periodontais, mesmo em casos de extrusão apical do cimento. Este não é reabsorvível, tem excelente actividade antimicrobiana e apresenta actividade na regeneração periodontal (Kossev *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009b; 2010). Alguns estudos evidenciaram a capacidade antibacteriana, particularmente o *Enterococos faecalis* (Zhang *et al.*, 2009b). Neste referido estudo, este cimento teve a capacidade de matar bactérias em dois minutos, facto suportado pelos autores pela combinação da hidrofília, alcalinidade elevada e pela difusão activa de hidróxido de cálcio. O pH deste cimento é de 12.8 (Koch *et al.*, 2010), e este pH mantém-se nas primeiras 24h, garantindo uma elevada actividade antibacteriana, essa capacidade decresce depois nos dias seguintes. Um outro estudo de Zhang *et al.*, 2010 comparou a citotoxicidade do iRoot SP/ES, AHP e ProRootMTA em fibroblastos de ratos, logo após aplicação dos cimentos e 24h depois. Foi concluído que o iRoot SP revelou uma ligeira citotoxicidade na fase após aplicação e às 24h essa citotoxicidade já não se registou, o AHP registou índices de citotoxicidade moderada nas duas fases e o Pro Root MTA não registou citotoxicidade em nenhuma das fases testadas. Por outro lado, um estudo de Willershausen *et al.*, 2011 avaliou também a citotoxicidade e propriedades antibacterianas ES, AHP, Guttaflow e Pulp Canal Sealer WT, através de testes de proliferação de fibroblastos e culturas de *E. faecalis* e *P. micra*. O estudo revelou nas suas conclusões que o ES não teve acção antibacteriana contra *E. faecalis* nem contra *P. micra*, no entanto, foi considerado juntamente com o Guttaflow o cimento mais biocompatível. Num outro estudo de citotoxicidade, Zoufan *et al.*, 2011, também com proliferação de fibroblastos, foi avaliada a viabilidade celular com ES, AHP, Guttaflow e Tubliseal, tendo sido concluído que o ES e o Guttaflow demonstraram menos citotoxicidade, e portanto maior viabilidade celular, do que o AHP e o GuttaFlow.

A contracção do cimento pós-presas é um factor importante, o fabricante afirma não haver contracção, e que pelo contrário poderá ocorrer ligeira expansão pós-presas. Segundo alguns autores, o facto de fluir bem nas irregularidades do sistema de canais, este material dispensa a aplicação de grandes quantidades de cimento, e pode inclusivamente a técnica de obturação prescindir de calor para este fim (Koch *et al.*, 2009). Desta forma, as nanopartículas biocerâmicas proporcionam-lhe uma maior fluidez no que se refere ao preenchimento de irregularidades de difícil acesso com força de adesão superior quando comparado com outros cimentos endodônticos (Nagas *et al.*, 2011). Candeiro *et al.*, 2012, publicaram um estudo que

avalia o comportamento físico-químico do ES e AHP, particularmente foram avaliados: pH, radiopacidade, libertação de íons cálcio e fluidez. Quanto à libertação de cálcio e pH os cimentos foram avaliados a 3, 24, 72, 168 e 240 h com um espectrômetro e medidor de pH, e os resultados registraram uma maior libertação de íons cálcio por parte do cimento biocerâmico, tendo também registado valores de pH superiores, na ordem dos 10-11 valores, contra valores na ordem dos 7 para o AHP; quanto à radiopacidade o AHP demonstrou ser mais radiopaco (6.90/AHP e 3.84 mm/ES), em relação à fluidez, o ES registou maior fluidez (26.96/ES e 21.17/AHP).

A Brasseler USA, apresentou após o lançamento do ES, cones de GP revestidos por partículas biocerâmicas, Endosequence BC Points, que segundo o fabricante conjuntamente com o cimento oferecem condições de selagem superiores. Anteriormente ao surgimento dos cones de GP revestidos por partículas biocerâmicas, surgiu para o Glass ionomer BC Sealer, os cones de gutta ActiV GP, que da mesma forma apresentam na sua superfície um recobrimento de partículas de ionómero de vidro maioritariamente compostas por silicatos de cálcio e silicato de alumínio. Desde logo surgiram estudos testando o ES com estes cones (Gonheim *et al.*, 2011); o silicato de cálcio presente no ES reage com moléculas de água ficando hidratado: gel hidratado de silicato capaz de se ligar quimicamente ao silicato de cálcio e de alumínio da superfície dos cones de gutta ActiV GP. (Apêndice 1, figura 3). O referido estudo de Gohneim *et al.*, 2011 refere uma resistência à fractura excelente quando aplicado conjuntamente com a GP revestida com partículas biocerâmicas relativamente ao ES quando em conjunto com GP convencional. Quanto às indicações relativamente à técnica de obturação, o fabricante assume que este cimento biocerâmico é recomendável para técnicas de obturação a frio, a sua aplicação pode ser realizada mediante um cone de papel, uma lima ou então, por injeção directamente no terço coronário através da seringa de apresentação muito fina 0.14 (“*capillary tip*”), onde já vem o cimento. O fabricante recomenda o uso deste cimento para a técnica de cone único, com base no sistema ActiV GP/Glass Ionomer Sealer, argumentando que a sua utilização juntamente com os cones de GP Endosequence BC points do próprio sistema forma uma obturação coesa como um monobloco (Apêndice 1, figura 3), no entanto, o fabricante não especifica claramente que o ES seja contra-indicado para outras técnicas de obturação, nomeadamente técnicas termoplásticas. Segundo alguns autores (Koch *et al.*, 2006; 2009; 2010 Part 1, Part 2) a preparação do sistema de canais para estes materiais biocerâmicos é mais conservadora relativamente a técnicas que referem como técnicas que

necessitam de “mais espaço” dentro do canal, e que a remoção de estrutura dentária nestas técnicas proporciona menos resistência á fractura. Segundo os autores referidos, sistemas como Resilon/Epiphany e Thermafil de GP termoplastificada são mais indicados com sistemas de instrumentação de conicidades variáveis com mais espaço na zona coronária, necessitando de mais cimento. Os cones GP com revestimento biocerâmico da Brasseler USA, são fabricados com conicidades constantes de 04 e 06 e são calibrados de forma a, que a sincronicidade entre cone e a preparação sejam perfeitos, para que se reduza a remoção de estrutura dentinária e a quantidade de cimento na obturação. Neste caso os autores referem que para a obturação com ES, a preparação do canal para a TCU deve ser de conicidade constante porque alegadamente tem maior predictibilidade do que as preparações de conicidade variáveis. Segundo aqueles autores, este facto simplifica a técnica, referem que a sincronicidade entre a preparação constante e o cone biocerâmico do sistema cria uma hidráulica excelente, e portanto, é recomendada a aplicação de pequenas quantidades de cimento. Os cones de GP ao serem recobertos por partículas biocerâmicas com o mesmo princípio do cimento produzem uma obturação muito coesa e sem contracção, ponto crítico das técnicas a quente. Em suma, cria-se uma ligação em resultado da formação de hidroxiapatite pós-presa, associada á ligação também das partículas biocerâmicas do cimento às partículas da GP. Não existe também nenhuma contra-indicação na remoção quer do cimento mesmo ou da combinação com os cones de GP do sistema ActiV GP (Koch *et al.*, 2009), em casos de retratamento, a obturação ES/ActiV GP pode ser removida facilmente, quer por meios rotatórios quer manuais (Ersev *et al.*, 2012). A justificação prende-se com o facto desta obturação com cone único recoberto com nanopartículas biocerâmicas, formar um núcleo coeso que é então, removido como um todo com instrumentos manuais, outra justificação relaciona-se com a rigidez consequente da formação deste núcleo (Koch *et al.*, 2006; Roggendorf *et al.*, 2010).

2.2 Nitrato de Prata e Nanoinfiltração

O nitrato de prata é um corante que foi inicialmente utilizado em Medicina Dentária na década de 80 por Wu *et al.*, 1983 em estudos macroscópicos de infiltração marginal de restaurações em Dentisteria Operatória, método que com facilidade despertou também a atenção de outros autores, Yu *et al.*, 1992. O grande impulsionador deste método foi H. Sano, durante a década de 90 (Sano *et al.*, 1994) ele e o seu grupo de investigadores utilizaram o nitrato de prata como método de avaliação da selagem dentina/restauração no âmbito da Dentisteria Operatória através de testes de infiltração que visavam avaliar a qualidade da camada híbrida com microscopia electrónica. A interface restauração/dentina foi observada em restaurações de Classe V através de crio-MEV e de um método de penetração de iões de prata visualizado através de MEV convencional. O material testado foi o Clearfil Photo Bond, Kuraray Co. Ao Crio-MEV foi observada uma excelente adaptação do material às cavidades sem presença de espaços e ao MEV com penetração de iões de prata foram observados espaços abaixo da camada híbrida. As partículas de prata foram descritas como aglomerados de partículas densas e muito brilhantes em zonas onde não se visualizavam lacunas marginais. Em 1995, os mesmos autores realizaram mais um estudo na procura de comprovar um novo padrão de infiltração distinto da microinfiltração, muito útil e vantajoso na pesquisa da qualidade da selagem dos materiais de restauração. Neste estudo, Sano *et al.*, 1995 testaram mais do que um material de restauração e o protocolo de nitrato de prata aplicado foi aquele que é aceite e aplicado actualmente nos testes de nanoinfiltração. Neste estudo as amostras foram também visualizadas ao MEV de electrões secundários, além da visualização ao MEV *Backscattered* ou MEV de electrões retrodifundidos (Apêndice 1, figura 6). Os resultados comprovaram mais uma vez, existir um padrão de nanoinfiltração sem a necessidade de existirem lacunas marginais, comparando as imagens aos dois microscópios foi concluído que as imagens ao MEV de electrões retrodifundidos são mais pormenorizadas, mais nítidas, e assim com mais vantagens (Sano *et al.*, 1995b). Houve, então, uma evidente necessidade de distinguir a microinfiltração da nanoinfiltração. A microinfiltração foi descrita por estes autores como um padrão de infiltração macroscópico e marginal (lacunas de 10 a 20 μm), portanto um padrão macroscópico, enquanto a nanoinfiltração foi caracterizada como um padrão de infiltração *nano-sized* (Sano *et al.*, 1994; 1995a) em que a passagem de partículas ocorre em lacunas muito menores entre 20 a 100nm sem a necessidade da presença de lacunas

marginais absolutamente necessárias ao padrão de microinfiltração, este novo padrão ficou conhecido como *nanoleakage*.

A nanoinfiltração é, assim amplamente referida em estudos de Dentisteria Operatória e Prostodontia Fixa com o intuito de explicar o comportamento dos materiais no que se refere à interface dente/restauração (camada híbrida) (Tay *et al.*, 2002; Babb *et al.*, 2009; Hiraishi *et al.*, 2009; Dündar *et al.*, 2011). Na Endodontia, os estudos de nanoinfiltração são aplicados maioritariamente em estudos de materiais de obturação de características adesivas apelidados de materiais de obturação endodôntica tipo monobloco como o Resilon-Epiphany, EndoRez, MetaSeal, RealSeal em que se forma camada híbrida para melhorar a adesão e selagem à dentina, e também em materiais de retro-obturação, para avaliar a sua capacidade de selar/obturar tridimensionalmente os canais radiculares no terço apical no caso dos materiais retro-obturadores. Um estudo relativamente recente, Chittoni *et al.*, 2012, avaliou a capacidade de selagem de 4 tipos de materiais de obtura  o retrógrada MTA, C.Portland, Sealer 26 e Super EBA, este estudo teve como objectivo avaliar a nanoinfiltra  o na interface dentina/material obturador nos 3mm apicais através da visualiza  o ao MEV de electrões retrodifundidos com NP amoniacal, seguindo o protocolo sugerido por Sano *et al.*, 1994; 1995a,b. Tay *et al.*, em 2005, desenvolveu um estudo de nanoinfiltra  o com NP em que avalia a capacidade de selagem Resilon/Epiphany e AHP com a TCVOC. Pesquisaram a presença de lacunas ao longo do canal radicular ao MEV e ao MET observaram a qualidade de selagem no terço apical. Concluiu-se não ter sido atingida a selagem completa dos canais radiculares com nenhum dos dois materiais, tendo sido identificadas ao TEM algumas zonas com depósitos de NP na interface cimento/camada híbrida no Resilon/Epiphany e entre a GP e o AHP. Ao MEV foram observadas tanto zonas de selagem como presença de lacunas na interface dentina/cimento nos dois materiais, adicionalmente foi destacado que no grupo do AHP/GP observou-se frequentemente separa  o da GP do AHP e também bom ajuste entre a dentina e o cimento. No grupo do Resilon/Epiphany foi frequente a presença de lacunas entre o cimento e a dentina e boa adapta  o do cimento    GP. Foi concl  ido que nenhum dos materiais foi capaz de selar tridimensionalmente o canal radicular, e que as lacunas observadas se encontraram em locais diferentes, no caso do AHP/GP as lacunas foram frequentes entre a GP e o cimento e no Resilon/Epiphany entre a dentina e o cimento.

Existe, no entanto, pouca bibliografia no âmbito de avaliar a capacidade de selagem de cimentos endodônticos, particularmente biocerâmicos comparativamente ao AHP através da

aplicação de uma metodologia de infiltração por NP e posterior visualização ao MEV de electrões retrodifundidos.

Wu e Cobb *et al.*, 1983, utilizaram o NP como um método para quantificar os microespaços da camada subsuperficial de resinas compostas relacionando resultados *in vitro* com o desgaste *in vivo*. O NP é uma molécula iónica com 0,59 nm de diâmetro, o tamanho reduzido da partícula e a capacidade de se ligar às fibras de colagénio dentinárias tornou o NP um marcador muito eficaz na detecção das microporosidades na interface dentina/restauração. No início da sua aplicação, houve alguma discrepância no protocolo, nomeadamente nos tempos aplicados nas várias fases do seu protocolo de utilização, tanto nas características químicas da solução como no tempo de exposição à luz reveladora, era vulgarmente utilizada a solução de 50% peso/volume e imersão dos espécimes por 60h e 8h na solução reveladora sob luz fluorescente, ou também a mesma proporção peso/volume com 2h de imersão, 18h de imersão e 6h de revelação (Gwinnett *et al.*, 1985; Abdel-Wahab *et al.*, 2008). A popularidade desta solução cresceu em consequência das vantagens que proporcionava, tais como: boa capacidade de penetração, superior aos outros métodos, mesmo com pequenas ampliações de 20x, facilidade de leitura e resultados fidedignos a curto e longo prazo, uma vez que as partículas finas de prata, uma vez impregnadas já não se difundem mais ao longo do tempo (Wu *et al.*, 1983; Sano *et al.*, 1995a,b). A precipitação dos iões de prata pigmenta as regiões permitindo que sejam visualizadas durante a análise como aglomerados de prata muito brilhantes (Sano *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2000; Tay *et al.*, 2002). A solução primeiramente formulada tinha um carácter ácido com um pH 4.2, actualmente, existem soluções tamponadas com pH neutro ou com um carácter básico pH 9 (solução amoniacal). As duas últimas formulações assegurariam que não existiria desmineralização da dentina que alguns autores invocavam que poderia ocorrer com a aplicação de formulações acídicas (Li *et al.*, 2001). Tay *et al.*, 2002 conduziu um estudo em que comparou duas formulações diferentes de NP, uma formulação ácida ou dita convencional e uma básica ou amoniacal, desta forma foi também investigada a possibilidade de existir desmineralização com a formulação de carácter ácido. Concluiu-se existir apenas uma diferença no padrão das partículas de prata, na solução ácida o padrão é mais reticulado e na formulação básica o padrão além de reticulado é também pontado sem qualquer desmineralização. Durante algum tempo os estudos não referiam qual a solução utilizada nas investigações, no entanto, segundo a literatura actual a

solução preconizada é a amoniacal de 50% peso/volume, o tempo médio de imersão na solução é de 24h (Sano, *et al.* 1994, 1995a,b; Kubo, *et al.*, 2002, Tay *et al.*, 2002), e o tempo de revelação de 8h (Sano, *et al.* 1995a,b; Kubo, *et al.*, 2002, Tay *et al.*, 2002).

Com efeito, o NP sugere ser um bom marcador e já com provas dadas na investigação desde os anos 90, sendo que a sua aplicação está tornar-se crescente nos estudos em Endodontia e parece constituir uma boa alternativa relativamente a outras metodologias de infiltração.

3. Metodologia de Estudo

3.1. Objectivos:

- i.** Comparação da adaptação marginal às paredes canulares entre os cimentos de obturação canal AHPlus, e EndoSequence BC Sealer/iRoot SP.
- ii.** Comparação da adaptação marginal no terço coronário, médio e apical entre os cimentos de obturação canal AH Plus e EndoSequence BC Sealer/iRoot SP.
- iii.** Comparação da adaptação marginal entre o terço coronário, médio e apical dos cimentos de obturação canal AHPlus e EndoSequence BC Sealer/iRoot SP .

Hipótese nula (H0): Não existem diferenças na adaptação marginal dentina/cimento entre os dois cimentos.

Hipótese nula (H1): Não existem diferenças entre a adaptação marginal dentina/cimento entre os dois cimentos relativamente aos terços apical, médio e coronário.

Hipótese nula (H02): Não existem diferenças entre a adaptação marginal dentina/cimento relativamente aos terços apical, médio e coronário de cada um dos cimentos.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Selecção dos dentes

Seleccionaram-se 26 dentes unirradiculares recentemente extraídos, que foram posteriormente imersos numa solução de cloramina a 0,5% (Tay *et al.*, 2005). Apêndice 2, figura 1

Critérios de inclusão:

- Dentes com um só canal;
- Dentes sem curvaturas radiculares;
- Dentes com raízes intactas;
- Dentes com comprimento de 22mm± 2mm.

Critérios de exclusão:

- Dentes com reabsorções;
- Dentes com fracturas radiculares;
- Calibres apicais superiores a 0,40mm;
- Dentes com ápices imaturos;
- Dentes impossíveis de permeabilizar, mesmo com uma lima K 08 ou K 06;
- Dentes previamente obturados.

Os dentes foram submetidos a radiografias pré-operatórias, com projecção ortogonal e proximal, de forma a uniformizar a amostra seleccionando dentes com anatomia interna semelhante e com um só canal. Posteriormente, a sua superfície externa foi limpa com pontas de ultra-sons e curetas e os dentes conservados à temperatura de 4°C, para evitar proliferação bacteriana.

3.2.2. Preparação e obturação das raízes:

O comprimento das raízes foi uniformizado, e, por isso, os dentes incluídos na amostra foram cortados a 12mm do ápex. Este comprimento permite que o terço coronário, médio e apical tivesse cada um uma espessura de 4mm. O corte foi efectuado com um disco de carburundum, colocado numa peça de mão. (Apêndice 2, figura 2). Depois de cortados, introduziu-se uma lima 10K (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça), sob observação ao microscópio clínico Leica M320 F12 (Leica MicroSystems, Wetzlar, Alemanha), até visualização da mesma ao nível do ápex. Ajustou-se a respectiva referência de borracha ao

topo da raiz, retirou-se a lima e anotou-se o respectivo comprimento. O comprimento de trabalho (CT) foi depois estabelecido subtraindo um milímetro a esta medição. Em seguida instrumentaram-se os canais criando-se uma via de permeabilidade com limas manuais K 10, 15 e 20 (Dentsply/Maillefer, Suíça) antes de iniciar a instrumentação mecanizada. Os canais foram instrumentados até um calibre apical de 40.06 (Brackett *et al.*, 2006; Paragliola *et al.*, 2010; Parente *et al.*, 2010; DeDeus *et al.*, 2011), usando o sistema de limas ProTaper Universal® com o motor X Smart® (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça), segundo a sequência S1,Sx,S1,S2,F1,F2,F3, F4, a 250 rpm e com o binário que o fabricante recomenda para cada lima (Apêndice 2, figura 3). A calibração do ápex foi realizada com limas manuais K de NiTi (NiTiFlex, Dentsply/Maillefer, Suíça). Raízes com calibre apical superior a 40 foram descartadas. Entre limas os canais foram irrigados com 2 ml de NaOCl a 5,25% (van der Sluis *et al.*, 2006), com seringa de polipropileno de 5ml (Ultradent Products Inc, South Jordan, UT) e agulha 30G “flat-ended” (Navitip, Ultradent, South Jordan, UT), posicionada a 2mm CT (Boutsioukis *et al.*, 2010), e permeabilizados com uma lima 10K (Vera *et al.*, 2011). Em seguida, efectuou-se o protocolo final de irrigação mediante a irrigação com 2mL de NaOCl a 5,25%, activado com ultra-sons por 1 min (ciclos de 20seg, repetidos 3 vezes), perfazendo um volume total de irrigante de 6mL (van der Sluis *et al.*, 2010). A activação ultra-sónica foi realizada utilizando uma ponta IrriSafe® nº 20 de 25mm (Acteon, Merignac, France) (Jiang *et al.*, 2010), numa unidade piezoeléctrica (Suprasson PMax, Acteon), na potência 4 (frequência de 30 kHz e uma amplitude da ponta da lima de 11 µm) (Verhaagen *et al.*, 2012). A ponta de ultra-som foi inserida a 1mm do CT (Jiang *et al.*, 2010). Em seguida irrigou-se com 1 mL de EDTA a 17% durante 1 min (Ozgur Ozdemir *et al.*, 2012), seguido de 2 mL de NaOCl a 5,25% (van der Sluis *et al.*, 2006) (Apêndice 2, figura 4). Seguidamente, secaram-se os canais com cones de papel F4® e procedeu-se à obturação canalar com técnica de compactação vertical de onda contínua, utilizando o sistema B&L® (B&L Biotech, Seul, Coreia) (Apêndice 2, figuras 5, 6 e 7).

Distribuição aleatória das amostras por grupos antes da obturação canalar:

GRUPO 1 (n= 12)

Obturação com cimento AH Plus® e cones de gutta percha Protaper F4®.

GRUPO 2 (n= 12)

Obturação com cimento EndoSequence BC Sealer® e cones de gutta percha Protaper F4®.

GRUPO CONTROLO (n= 2)

Sem obturação

A quantidade de cimento foi de 1,25mL, igual em cada um dos grupos (DeDeus *et al.*, 2002). O cimento AHPlus foi misturado conforme instruções do fabricante. Realizaram-se radiografias pós-operatórias para controlar a correcta obturação. Dois dentes não são obturados e servem de controlo negativo para observar a eficaz remoção da *smear layer*. As amostras foram armazenadas a 37° e com 100% de humidade, por 24h, de forma a completar a presa dos cimentos (Nielsen *et al.*, 2006) (Apêndice 2, figura 8).

3.2.3. Técnica laboratorial para Protocolo de nanoinfiltração com Nitrato de Prata:

Seleccionaram-se 2 cores diferentes de verniz de unhas, um para o grupo 1 e o outro para o grupo 2. As amostras foram envernizadas com duas camada de verniz ao longo da raiz, excepto em 2 mm ao redor do canal radicular para permitir a impregnação do NP apenas na zona não envernizada (Apêndice 2, figuras 9, 10 e 11). Os dentes foram, então, imersos na solução de NP amoniacal durante 24h a 37° dentro de um tubo *Eppendorf* (Apêndice 2, figuras 12 e 13) e colocados de seguida em cilindros escuros e fechados. Passado esse tempo (Apêndice 2, figura 14), as amostras foram lavadas em água corrente por um minuto e colocadas na solução reveladora durante 8h sob uma luz fluorescente (Tay *et al.*, 2002), de forma a reduzir os iões em grãos de prata (Tay *et al.*, 2002) (Apêndice 2, figuras 15 e 16). Após este tempo, as amostras foram lavadas em água corrente durante 1 minuto e removido o verniz por raspagem (Lopes, *et al.*, 2007) (Apêndice 2, figura 17).

3.2.4. Preparação das amostras para observação ao MEV:

As amostras foram seccionadas perpendicularmente ao longo eixo a 1mm, 5mm e 8mm do ápex, com uma lâmina de diamante (Isomet 1000, Buehler Ltd.), sob refrigeração, para obter de cada terço duas amostras radiculares com espessura de $1,5 \pm 0,2\text{mm}$ (Apêndice 2, figuras 18, 19 e 20). As amostras foram identificadas e imediatamente imersas em 2,5% de glutaraldeído / 2% de paraformaldeído e em 0,1M de cacodilato de sódio tamponado com pH 7,4, por 12h a 4°C (Apêndice 2, figuras 10 e 22). Após fixação, as amostras foram lavadas com 20mL de 0,1M de cacodilato de sódio tamponado, durante 1h (a solução é trocada a cada 20 min) (Lopes, *et al.*, 2007) (Apêndice 2, figuras 23 e 24). Em seguida, as amostras foram lavadas com água destilada por 1 minuto. As amostras foram desidratadas com imersões ascendentes de etanol (25% por 20 minutos, 50% por 20 minutos, 75% por 20 minutos, 95% por 30 minutos e 100% por 60 minutos) (Apêndice 2, figura 25). Após a etapa final de etanol, as amostras foram colocadas num papel filtro dentro de uma caixa de petri coberta durante 8h até secarem (Apêndice 2, figura 26), depois foram imersas numa solução de 1:1 de etanol a 100% e *hexamethyldisilazane* (HMDS, Ted Pell Inc.) durante 5 minutos à temperatura ambiente (Perdigão *et al.*, 1995). Em seguida, as amostras são imersas em HMDS, durante 10 min. (Apêndice 2, figura 27). Após esta fase, os discos radiculares foram estabilizados com cera colante em cilindros previamente vaselinados e depois embebidos em resina epoxi autopolimerizável Epo-Thin (Buehler Ltd.) e armazenados à temperatura ambiente por 18h (Lopes, *et al.*, 2007) (Apêndice 2, figuras 28 e 29). Após polimerização, a superfície das amostras foram polidas com discos de silicone com abrasão decrescente (até 1200 grit) debaixo de água: (Apêndice 2, figuras 30 e 31).

240 grit por 30 seg

400 grit por 30 seg

600 grit por 30 seg

800 grit por 30 seg

1200 grit por 30 seg

O polimento foi concluído com um disco de tecido e com uma suspensão diamantada cada vez mais fina até partículas de 0.05 microns (Buehler Ltd.). (Apêndice 2, figura 32). O topo da resina epoxi foi protegida com fita não-adesiva e seccionada com lâmina de diamante para separar a amostra do bloco de resina epoxi (Apêndice 2, figura 33). Em seguida, as

amostras foram lavadas com água destilada e deixadas a secar. Posteriormente, as amostras foram montadas em discos de alumínio e revestidos com fita adesiva de carbono (Ted Pella Inc.) (Apêndice 2, figuras 34 e 35). A fita de carbono exposta é seguidamente recoberta com uma camada de uma suspensão de prata coloidal de secagem rápida (Ted Pella Inc.), para tornar a superfície mais condutora e impedir a acumulação de electrões dentro da câmara do MEV (Apêndice 2, figura 36). As amostras foram seguidamente, aurificadas com E-5100 *sputter-coater* (Polaron Ltd.) a 20 mA por 90s (Lopes, *et al.*, 2007) (Apêndice 2, figuras 37 e 38). Aspecto das amostras após aurificação (Apêndice 2, figura 39).

As amostras foram observadas ao MEV de electrões retrodifundidos com voltagem 15 Kv (JEOL JSM 7001F, Tóquio, Japão) (Apêndice 2, figuras 40 e 41). O operador, que realizou a leitura das imagens, não sabia a que cimento as imagens correspondiam.

4. Avaliação da infiltração e Análise Estatística:

As imagens foram avaliadas na sua extensão ao longo de 360°. Os discos foram divididos em 4 quadrantes para fazer uma leitura dicotómica por quadrante, sendo que cada disco teve 4 leituras quanto à presença ou ausência de NP.

Foi utilizado o Microsoft Office Powerpoint 2007, de forma a montar imagens a 250x de todo o perímetro da interface dentina/cimento da amostra, tendo como referência os limites dos quadrantes com uma ampliação menor de forma a identificar referências á medida que se avançava na leitura.

(Apêndice 4, figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 14, 15 e 16).

Avaliação da presença/ausência de NP:

Foram observados 4 quadrantes por disco.

Foram descartados um total de 24 discos, 12 discos por grupo.

- Grupo 1 AHP : 60 discos
- Grupo 2 ES : 60 discos

Na observação microscópica das duas raízes controlo foi possível observar a remoção da *smear layer* após fractura vertical com evidência de abertura dos túbulos dentinários (Apêndice 3, figuras 16, 17 e 18).

Na análise estatística foram aplicados o teste Qui-quadrado na comparação dos dois grupos e testes não paramétricos na comparação dos terços radiculares. O *software* utilizado foi o SPSS 16.0 para Windows, (SPSS, Chicago, USA)

O *software* utilizado foi o SPSS 16.0 para Windows (SPSS, Chicago, USA)

5. Resultados:

Num universo de 24 amostras, 12 amostras por grupo, 6 discos por amostra (72 discos) com 4 leituras cada disco (presença/ausência de NP), resultaria em 576 leituras no total, 288 leituras por grupo, tendo em conta que se perderam 24 discos, 12 discos em cada grupo, o total de discos analisados foi de 120, e portanto foram analisados 60 discos por grupo, o que se traduz em 240 leituras por cada grupo e um total de 480 leituras.

1) Comparação entre os dois grupos AHP e ES:

Comparando os dois grupos em estudo relativamente à presença de NP, não houve diferenças estatisticamente significativas, aplicando o teste de Qui-quadrado ($P=.327$).

Grupo 1 (AHP): foi observada a presença de NP em 139 leituras (58%),

Grupo 2 (ES): foi observada a presença de NP em 120 (50%) menos 8% do que no grupo do AHP.

Dentro de cada grupo, na correlação entre os terços aplicando testes não-paramétricos:

2) Comparação entre os terços do grupo AHP :

Grupo 1 (AHP): não foi encontrada correlação entre os três terços ($P=.118$).

3) Comparação entre os terços do grupo ES:

Grupo 2 (ES): foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre seus terços ($P<.01$) (Apêndice 5, Quadros 4 a 11). Na comparação dos terços houve diferenças entre o terço apical e o terço coronário, tendo o terço coronário mais leituras com presença de NP do que o apical, e também entre o terço médio e coronário, tendo igualmente o terço coronário mais leituras com presença de NP, entre o terço médio e apical não houve diferenças estatisticamente significativas.

4) Comparação de cada terço entre os dois grupos AHP e ES:

Terço coronário: sem diferenças estatisticamente significativas ($P=.8$).

Terço apical: sem diferenças estatisticamente significativas ($P=.7$).

Terço médio: diferenças estatisticamente significativas com o grupo 1 (AHP) a registrar pior adaptação marginal ($P<.01$) (Apêndice 5, Quadro 1, 2 e 3):

- **Grupo 1 (AHP):** 5 discos registraram um quadrante com presença de NP; 15 discos com dois quadrantes com presença de NP.
- Grupo 2 (ES): 13 discos registraram um quadrante com presença de NP; 7 discos com dois quadrantes com presença de NP.

A hipótese nula (H0) “Não existem diferenças na adaptação marginal dentina/cimento entre os dois cimentos” foi uma hipótese aceita, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na adaptação marginal dentina/cimento entre os dois grupos.

A hipótese nula (H1) “Não existem diferenças na adaptação marginal dentina/cimento comparando os dois cimentos relativamente aos terços apical, médio e coronário”, foi uma hipótese rejeitada, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os terços médios.

A hipótese nula (H02) “Não existem diferenças na adaptação marginal dentina/cimento relativamente aos terços apical, médio e coronário de cada um dos cimentos” ,foi uma hipótese rejeitada, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o terço coronário e o terço apical, e também entre o terço coronário e o terço médio no grupo 2 (ES).

6. Discussão:

Existem no âmbito do estudo da adaptação marginal diversas metodologias de avaliação, no entanto, não existe nenhum método universalmente aceite como o melhor na avaliação da adaptação marginal em endodontia (Wu e Wesselink *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2000; Tay *et al.*, 2005). Particularmente Wu e Wesselink publicaram um estudo que teve como objectivo avaliar vários métodos de infiltração, no qual foi aplicada a técnica de condensação lateral (TCL), tendo sido testados inúmeros métodos de infiltração, tais como a infiltração por meio de bactérias, de glicose, por penetração de fluídos, ou por meio de corantes (rodamina B, eosina, tinta da china, azul de metileno e NP). Relativamente á infiltração por meio de NP, foi sublinhada a importância do tamanho da molécula, que por ser muito pequena reúne os requisitos necessários aos testes de infiltração, tal como a glicose. Nesse mesmo estudo, é ainda realçado o facto de que, apesar de as bactérias e seus produtos terem um tamanho maior, importa saber se partículas menores conseguem penetrar, ou seja, se há possibilidade de haver passagem de moléculas de dimensão mais reduzida como é o caso de nutrientes como a glicose, pois se houver, isso significa que os micro-organismos pré-instalados poderão através desses nutrientes subsistir no sistema de canais e dar lugar á multiplicação e perpetuação de lesões periapicais. Os corantes como azul de metileno, eosina, rodamina B, tinta da china têm um tamanho molecular pequeno que lhes confere aceitabilidade para testes de infiltração, no entanto, no caso do azul de metileno sendo uma solução acídica existe a possibilidade de ocorrer desmineralização da dentina conduzindo a uma maior infiltração, facto que não acontece com a solução de NP actualmente utilizada. Como já citado, a solução amoniacal é uma reformulação da primeira solução acídica, e que por isso não desmineraliza os tecidos dentinários (Tay *et al.*, 2002). Outra possível desvantagem de outros corantes é a penetração por capilaridade quando no canal existe água, dando lugar a uma maior penetração de corante até que se atinja um equilíbrio químico entre o corante e as moléculas e água, por outro lado a eventual presença de bolhas de ar presas dentro dos canais poderá constituir um entrave á penetração do corante, e em estudos volumétricos, uma maior penetração de corante não significa necessariamente a presença de uma lacuna maior uma vez que a presença de água ou ar influencia essa penetração (Goldmann *et al.*, 1989), no entanto, o uso destes metodologias por vácuo poderá ajudar a ultrapassar este problema (Goldmann *et al.*, 1989; Spånberg *et al.*, 1989; Oliver *et al.*, 1991)),. Num outro artigo Youngson *et al.*, 1989, foram comparadas metodologias de microinfiltração

por corantes, (NP, eosina, tinta da china e azul de metileno; pH ácidos e básicos para todas as soluções; tamanho de partícula entre $<1\mu\text{m}$ - $600\mu\text{m}$; separação radicular por fractura vertical e separação com disco diamantado com refrigeração) os corantes foram aplicados por 1h em 42 pré-molares com cavidades abertas. Foi avaliada a penetração dentinária e conclui-se existirem algumas diferenças significativas na extensão da penetração canalar associadas a cada corante, no entanto nenhum dos parâmetros avaliados teve impacto na penetração dos corantes, no caso do NP, o protocolo incluiu as soluções acídica e amoniacal, 1h de imersão na solução, 12h sob luz fluorescente e mais 36h em solução reveladora e mais 3h sob luz fluorescente. Foi observada uma menor penetração comparativamente ao azul-de-metileno (solução básica) limitação relacionada não com o corante, mas com a dificuldade da penetração em sistemas canulares complexos da substância reveladora por esta ter um peso molecular maior, não havendo a redução completa da prata ao seu estado químico elementar (Tay *et al.*, 1995), apesar de no presente estudo o protocolo aplicado ter sido o mais comumente utilizado em estudos com NP, e também de terem sido utilizadas raízes unirradiculares, a não redução de NP ao seu estado químico elementar em algumas zonas poderá ter dado lugar a algumas lacunas vazias na interface dentina/cimento. Alguns estudos também sublinham que o tempo de imersão na solução pode ser um factor importante em alguns corantes, uma vez que mais tempo de imersão poderá significar maior penetração. No caso do NP o tempo de imersão recomendado por Sano *et al.*, 1995 é de 24h, sendo que alguns trabalhos sustentam que a substância iónica de NP uma vez que penetra nos tecidos não continua a difundir-se mais ao longo do tempo não alterando, assim a quantidade de infiltração da molécula (Wu *et al.*, 1983; Schaffer *et al.*, 1987; Gwinnett *et al.*, 1995; Singer *et al.*, 2000). Com efeito, este facto parece ser uma vantagem relativamente a outros corantes.

Outra vantagem descrita por alguns autores é a facilidade de leitura ao MEV, (Sano *et al.*, 1995; Tay *et al.*, 2002); a partícula de prata surge com um padrão muito característico e brilhante (Apêndice 3, figura 7, gráfico 5; Apêndice 4, EDS 5) distinguindo-se facilmente de outros elementos da imagem o que permite uma leitura dicotómica, mesmo com baixas ampliações (Santos, V., Tese de Mestrado, ISCSEM, 2008) no presente estudo as leituras foram realizadas com ampliações de 250x, adicionalmente a utilização de análise de espectroscopia ou energia dísperível de raio-X (EDS) que tem por base identificar os diferentes elementos químicos presentes em pequenas partes da imagem foi também uma ferramenta de confirmação. Neste estudo o EDS foi utilizado como auxílio adicionalmente á

identificação visual da partícula de prata e de outros elementos atômicos presentes com ampliações obrigatoriamente maiores devido à área necessária para a identificação pelo EDS, como exemplo foram identificados elementos como o zinco na GP (Apêndice 3, figura 6, gráfico/EDS 4), a zircônia no cimento ES (Apêndice 3, figuras 4 e 5, gráfico/EDS 2 e 3), ou o tungstênio nas zonas preenchidas com cimento AHP (Apêndice 3, figuras 1, 2 e 3, gráfico/EDS 1), estes dois elementos apesar de terem um nº atômico elevado (Zr-40 e W-74) apresentam-se em pequena quantidade e combinados com outros metais como o cálcio produzindo o tungsteneato de cálcio presente no AHP ou o óxido de zircônia presente no ES. Estas partículas surgem também como aglomerados brilhantes, menos densos facilmente distinguíveis do padrão morfológico mais brilhante da prata. O AHP distingue-se do ES por apresentar partículas com uma forma geométrica característica. A prata é um elemento químico de transição nº 47 da tabela periódica, um metal que apresenta no seu núcleo 47 prótons (Z-47, A-107,9) 57 neutrões e na nuvem electrónica 47 electrões, comporta-se como um catião Ag^+ com a tendência a perder um electrão, o átomo fica carregado positivamente, o nitrato o anião NO_3^- tem tendência a ganhar um electrão e quando se combina com o catião prata resulta uma molécula electricamente nula ($AgNO_3$). A sua visualização ao MEV torna-se possível devido a estas características químicas (Apêndice 3, figura 7, gráfico/EDS 5). Quando o feixe de electrões atravessa a amostra dependendo da profundidade liberta electrões secundários de superfície e electrões da camada mais inferior os sub-refractários (Apêndice 1, figura 6) permitindo a redução da prata ao seu estado químico elementar e posterior visualização dos aglomerados de prata com um aspecto muito brilhante (Sano *et al.*, 1995; Li e Tias 2001; Tay *et al.*, 2002). O NP como marcador tem a vantagem de ser uma partícula muito pequena permitindo a penetração em zonas onde existem nanoporosidades localizadas entre a parede radicular e o cimento, falhas dentro do próprio cimento e até mesmo no interior da GP, uma vez que esta é um sólido poroso que sofre alguma contracção após arrefecimento quando utilizadas técnicas a quente, podendo desta forma, deixar lacunas não preenchidos por cimento (Apêndice 3, figura 9). Nas imagens é possível visualizar em virtude do EDS, uma forte interacção entre a obturação (GP+cimento) e o NP (Apêndice 3, figura 10, gráfico/EDS 6). As ampliações utilizadas neste estudo foram de 250xs, não sendo por isso possível visualizar nanoporosidades, no entanto observou-se presença de NP nas lacunas entre a dentina e a obturação (Apêndice 3, figura 9). Em virtude desta lógica seria de esperar, uma infiltração em que o NP se infiltraria em todas as lacunas vazias de material, no entanto,

foram identificados frequentemente em ambos os grupos lacunas com NP, mas não totalmente preenchidos pelo marcador (Apêndice 3, figura 11), tendo em conta que as amostras são imersas no marcador e este penetra em sentido corono-radicular previamente aos procedimentos laboratoriais de corte, fixação, desidratação e polimento das amostras, o factor tempo de imersão foi alvo de discussão por alguns autores, tendo sido por isso testados diferentes tempos de imersão, 1h, 2h, 24h, até que se concluiu que um período de 24h seria ideal, pois permitia uma penetração de NP mais eficaz relativamente a tempos de penetração como 1 ou 2h (Wu *et al.*, 1983; Schaffer *et al.*, 1987; Sano *et al.*, 1995; Gwinnet *et al.*, 1995; Singer *et al.* 2000). Relativamente ao pH da solução, como já referido foram testadas soluções de carácter ácido e amoniacal, pois chegou a pensar-se que o teor acídico da solução poderia causar desmineralização da superfície dentinária dando lugar a lacunas (Tay *et al.*, 2002), no entanto, alguns autores referem que pH da solução pode não ter um efeito significativo na infiltração e deposição do NP (Youngson *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2003). Neste estudo foi usada uma solução com pH 9, o nitrato de prata amoniacal, em virtude de ser a solução preconizada (Tay *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003).

Uma outra justificação para a presença de falhas entre a dentina e a obturação e de fendas dentinárias perpendiculares ao canal, poderá prender-se com alguns dos procedimentos para observação ao MEV. O corte das amostras, o polimento e o vácuo (Sano *et al.*, 1994) são procedimentos durante os quais poderá ocorrer perda irreversível das amostras. No presente estudo, foram perdidas durante estes procedimentos um total de 24 amostras (12 por grupo), essas perdas ocorreram devido a deslocação total e/ou parcial da obturação canal. Na fase de corte a lâmina poderá, eventualmente causar algum deslocamento e/ou arrastamento mecânico da obturação, em virtude da pequena dimensão dos discos, particularmente dos apicais (Apêndice 3, figuras 12 e 13). O polimento é um procedimento também ele imprescindível, (Drummond *et al.*, 1996), pois permite a limpeza removendo detritos para uma melhor visualização da superfície da amostra, no entanto, eventualmente tanto o corte como o polimento poderão induzir deslocamento total/parcial da obturação. Pode também ocorrer “arrastamento” da prata para a zona da dentina, dando a ilusão de que a prata se depositou na dentina originalmente durante a imersão, facto observado também em algumas amostras no no presente estudo (Apêndice 3, figura 14), no entanto, segundo Li *et al.*, 2002, a quantidade de prata infiltrada não é afectada por estes procedimentos, ao comparar a camada híbrida de amostras polidas e não polidas. No presente estudo, em algumas imagens é possível visualizar

NP e material de obturação dentro dos túbulos, facto que realça a importância da remoção da *smear layer* através da aplicação de um protocolo de irrigação. A sua remoção foi constatada na presente estudo pela observação de túbulos dentinários abertos e livres de detritos nas amostras do grupo controlo (Apêndice 3, figuras 16, 17 e 18). Desta forma, a remoção de *smear layer* adquire relevância, uma vez que segundo alguns investigadores melhora a qualidade de selagem, de forma a impedir crescimento bacteriano dentro dos túbulos dentinários (Pashley *et al.*, 1984; Bystrom *et al.*, 1985; van der Sluis *et al.*, 2006, 2007, 2009).

Um outro factor importante é o vácuo da câmara do MEV, alguns investigadores relatam ocorrência de danos causados nas amostras pela pressão induzida (Tay *et al.*, 2005). Esta pressão provoca fendas na dentina perpendiculares ao canal, e consequentemente deslocamento entre a obturação e a parede dentinária. Segundo Sano *et al.*, 1994, a desidratação das amostras e os procedimentos de polimento poderão igualmente contribuir para o aparecimento destas fendas, no entanto é de referir que ao não se encontrar prata nestas fendas demonstra que a infiltração do NP em particular não é afectada pelos procedimentos, uma vez que a imersão das amostras na solução ocorre numa fase anterior a estas (Li *et al.*, 2002). A ausência de NP nas fendas dentinárias foi constatada no presente estudo (Apêndice 3, figura 15). Assim, a utilização de um MEV sem vácuo poderá eventualmente ultrapassar esta problemática. Num estudo de Tay *et al.*, 2005, foi utilizado um MEV sem vácuo o *Field Emission Gun-Environmental Scanning Electron Microscopy* (FEG-ESEM), no qual se considera que a visualização de amostras hidratadas permite uma melhor distinção entre lacunas por selagem incompleta da obturação e fendas provocados pela pressão causada pelo vácuo do MEV convencional, no entanto, neste estudo, o corte das amostras foi longitudinal, a avaliação da selagem foi centrada na zona apical da obturação, tendo sido testados o GP/AHP e o Resilon/Epiphany como materiais de obturação.

Quanto á técnica de obturação, a TCVOC foi a técnica escolhida para o presente estudo, visto ser uma técnica muito investigada com evidência de bons resultados em termos de selagem, penetração tubular e adaptação às paredes canulares (Evans, *et al.*, 1986; Yared *et al.*, 1996; DeDeus *et al.*, 2002, 2004; Tay, *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009). DeDeus *et al.*, 2004, testou a influência que a técnica de obturação poderá ter na quantidade de penetração tubular, utilizou dentes unirradulares e dividiu-os por três técnicas de obturação: TCVOC, TCL e TCU. Neste estudo as raízes foram seccionadas verticalmente e avaliada a interface

dentina/cimento ao MEV. A conclusão, foi que a técnica que mostrou maior penetração tubular foi a TCVOC, tendo tido também um papel importante a remoção eficaz da *smear layer* proporcionada pelo protocolo de irrigação aplicado no estudo, protocolo semelhante ao aplicado na presente investigação com a diferença de que no estudo de DeDeus *et al.*, 2004, o EDTA foi deixado no sistema de canais por 3 minutos. O estudo já referido de Zhang *et al.*, 2009, a sua metodologia incluiu diferenças como método de filtração de fluídos/medições a 24h, 1, 4 e 8 semanas, na instrumentação foi utilizado sistema Protaper Universal e cones F3 na obturação, as amostras foram separadas longitudinalmente, não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos, nem na infiltração nem relativamente ao tempo. Houve mais infiltração no Grupo ES/CU F3, mas sem relevância estatística, registou-se também mais falhas entre a obturação e o cimento no grupo do AHP, mas igualmente sem relevância estatística. Foi constatado, não existirem diferenças em termos de infiltração apical entre o AHP e o cimento biocerâmico iroot SP/ES relativamente á técnica de compactação vertical de onda contínua. Os autores concluíram que não existiram diferenças entre os grupos de obturação, possíveis razões apontadas prenderam-se com a formulação inovadora do cimento biocerâmico, ausência de contracção pós-presa e características similares ao MTA. Foi também concluído no estudo referido que, para o cimento biocerâmico, a TCU é equivalente á TCVOC, este facto está em concordância com as indicações do fabricante que refere a TCU como uma das técnicas de obturação indicada para obturação com o cimento biocerâmico, no entanto, não existe qualquer referência do fabricante que contra-indique a aplicação do cimento biocerâmico com outras técnicas de obturação.

Dos 72 discos por grupo, foram descartados 12 em cada grupo em consequência do deslocamento da GP do canal, uma das justificações poderá estar relacionada com o tamanho pequeno dos discos, com força friccional provocada pelo corte e pelo polimento. Alguns estudos referem uma força de adesão superior dos cimentos biocerâmicos ao canal, com maior resistência á fractura radicular e ao deslocamento da GP (Tay *et al.*, 2007; Belli *et al.*, 2011; Gonheim *et al.*, 2011; Nagas *et al.*, 2011; Sokouhinejad *et al.*, 2011; Assman *et al.*, 2012).

Neste estudo a obturação foi analisada por terços através de cortes á semelhança de outros trabalhos de investigação no âmbito da qualidade de selagem (Balgerie *et al.*, 2011).

Dentro do grupo 2 (ES), constatou-se existirem diferenças estatisticamente significativas entre os terços coronário/médio e coronário/apical (Apêndice 5, quadros 4 a 11), estas diferenças demonstram que a nível coronário foi mais difícil obter uma selagem equivalente á conseguida nos outros dois terços, possíveis razões apontadas poderão estar relacionadas com a configuração anatómica da zona coronária, também com o perímetro coronário. Nesta zona do canal existe uma maior zona de contacto e, desta forma, estes resultados podem dever-se a uma quantidade insuficiente de cimento, a uma maior massa necessária de GP e ao índice de contracção pós-arrefecimento mais elevado. Outro factor que poderá contribuir para uma maior presença de NP no terço coronário é o sentido coronário da infiltração pelo NP, e desta forma, poderá eventualmente ocorrer uma maior deposição da solução nessa zona.

Relativamente à técnica de instrumentação e obturação, os canais foram instrumentados com o sistema de limas Protaper Universal com conicidades variáveis até à lima F4 e obturados com cones do sistema pela TCVOC. A adaptação inferior do ES, no terço coronário, observada no presente estudo, segundo alguns autores (Koch *et al.*, 2009, 2010), pode dever-se á não utilização do cimento biocerâmico com um sistema de instrumentação de conicidade constante e obturação sincronizadas, que segundo estes autores resulta numa obturação monobloco através de uma dinâmica hidráulica que alegam ocorrer no conjunto ES BC Sealer/cones ES BC Points que permite ao cimento fluir melhor nas zonas mais irregulares do canal. As *Shaping Files*, particularmente a SX é a lima do sistema Protaper Universal com maior diâmetro coronário, em D11 e D12 tem 113-115, a S1 em D11 e D12 tem 85,5 e 96 e a S2 em D11 e D12 tem 85 e 95,5, comparativamente aos instrumentos de conicidades constantes de 6% para um calibre apical de 40 na zona coronária o diâmetro em é de D11-106 e D12-112, diâmetros ligeiramente inferiores e pouco apreciáveis comparativamente ao sistema Protaper Universal. Relativamente ao diâmetro apical a lima F4 é semelhante a uma lima de conicidade constante de 6%, tem na parte activa uma conicidade menos variável em relação às limas que a precedem, nos primeiros 3 mm apicais a sua conicidade é de 6% e nos restantes mm tem 5%, facto que se prende com a finalidade de ser uma lima *Finishing* tendo como objectivo preparar os 3 mm apicais e, portanto não instrumenta a zona coronária onde o seu diâmetro é menor do que o próprio canal para evitar que a lima entalhe na dentina e fracture por torsão.

Tendo em conta a opinião dos autores atrás referidos, o facto de não se ter aplicado no presente estudo, o cimento biocerâmico com um sistema de instrumentação constante e obturação sincronizadas de que resulta a obturação “monobloco”, poderá ter afectado o comportamento do ES na adaptação marginal em algumas zonas do canal registadas na presente investigação, apesar de como já foi referido as diferenças no diâmetro do canal preparado com o sistema Protaper não ser apreciável. A sincronicidade, que alegadamente existe entre o cone e o canal, segundo os mesmos autores resulta da tecnologia aplicada ao fabrico dos cones, pois estes são fabricados com tecnologia laser em que o calibre é aperfeiçoado. A tecnologia de fabrico a laser não é aplicada ao fabrico dos cones Protaper, e portanto, segundo os autores referidos, a sincronicidade com o calibre do canal dada pela instrumentação com o sistema Protaper pode não ser tão aproximada, daí não se produzir a dinâmica hidráulica que alegam ocorrer no conjunto ES BC Sealer/cones ES BC Points que permite ao cimento fluir melhor nas irregularidades do canal.

A ligação monobloco entre paredes, cimento e GP, resultada de uma ligação química e mecânica entre estes três elementos em virtude da capacidade de ligação entre a GP e o cimento e da formação de hidroxiapatite pós-presas do cimento à dentina, ligações estas que não se verificam entre os cimentos de resina epóxy como o AHP e a GP. Na técnica termoplástica, a GP após o arrefecimento sofre contracção deixando lacunas que deverão ser preenchidos pelo cimento, este último dado poderá justificar que na comparação entre os terços dos dois grupos tenha sido observada uma diferença estatisticamente significativa no terço médio, tendo o grupo 1 (AHP) um índice de infiltração maior, sendo por isso rejeitada a hipótese nula (H1) (Apêndice 5, quadro 1, 2 e 3). A menor infiltração NP no grupo 2 (ES) no terço médio pode dever-se à presença de nanopartículas biocerâmicas que permitem formação de hidroxiapatite pós-presas do cimento à dentina e em concordância com resultados do estudo de Zhang *et al.*, 2009, da ausência de contracção e da maior fluidez no que se refere ao preenchimento de irregularidades de difícil acesso com força de adesão superior quando comparado com outros cimentos endodônticos (Koch *et al.*, 2006; Nagas *et al.*, 2011), e portanto, com potencialidade para preencher com cimento túbulos dentinários e lacunas entre a GP e as paredes dentinárias, promovendo uma boa selagem canalar mesmo na presença de humidade (Shokouhinejad *et al.*, 2011).

7. Conclusões:

Em ambos os grupos foram observados lacunas preenchidas com depósitos de prata na interface dentina/cimento, embora não tenham sido registradas diferenças estatisticamente significativas entre o total de infiltrações dos dois grupos (AHP/ES), na análise dos terços radiculares dentro de cada um dos grupos, o grupo 2 (ES) no seu terço coronário apresentou pior adaptação marginal comparativamente aos seus terço médio e apical, todavia relativamente á comparação entre os terços dos dois cimentos, registaram-se diferenças estatisticamente significativas no terço médio, no qual o grupo 2 (ES) registou melhor capacidade de adaptação marginal relativamente ao grupo 1 (AHP).

Em conclusão, comparando os dois cimentos endodônticos com instrumentação variável e obturação pela técnica de compactação vertical de onda contínua, poder-se-á aferir que a capacidade de adaptação dos cimentos foi equivalente, no entanto o EndoSequence revelou melhor adaptação marginal no terço médio.

Será, no entanto, necessária mais investigação no âmbito da obturação endodôntica com nanoinfiltração por nitrato de prata, assim como, no sentido de avaliar o comportamento do cimento biocerâmico EndoSequence BC Sealer/*iRoot SP* com outros sistemas de instrumentação e obturação endodônticos.

8. Referências Bibliográficas:

1. Abdel-Wahab S., Habib A. Einin E. Assesment of the nanoleakage of an antibacterial adhesive system and a resin modified glass ionomer liner. *Suez Canal Univ Med J*, 2008; 11(1):13-18.
2. Assmann E., Scarparo R., Böttcher D., Grecca F. Dentin bond strength of two mineral trioxide-based and one epoxy resin-based sealers. *JOE*, 2012; 38:219-21.
3. Azar N., Heidari M., Bahrami Z., Shokri F. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. *JOE*, 2000; 26(8):462-5.
4. Babb B., Loushine R., Bryan T., Ames J., Causey M., Kim J., Kim Y., Weller R., Pashley D., Tay F. Bonding self-adhesive (self-etching) root canal sealers to radicular dentin. *JOE*, 2009; 35(4):578-82.
5. Balgerie E., van der Sluis L., Vallaey K., Gurgel-Georgelin M., Diemer F. Sealer penetration and adaptation in dentinal tubules: a scanning electron microscopy study. *JOE*, 2011; 37(11):1576-9.
6. Baumgartner J., Mader C., A scanning microscopic evaluation of four root canal irrigants regimens. *JOE*, 1987; 13(4):147-57.
7. Belli S., Cobankara F., Ozcopur B., Eliguzeloglu E., Eskitascioglu G. An alternative adhesive strategy to optimize bonding to root dentin. *JOE*, 2011; 37(10):1427-32.
8. Behrend G., Cutler C., Gutmann J. An in vitro study of smear layer removal and microbial leakage along root-canal fillings. *IEJ*, 1996; 29(2):99-107.
9. Bin C., Valera M., Camargo S., Rabelo S., Silva G., Balducci I., Camargo C. Citotoxicity and Genocytotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *JOE*, 2012; 38(4):495-500.
10. Brackett M., Martin R., Sword J., Oxford C., Rueggeberg F., Tay F., Pashley D. Comparison of seal after obturation techniques using a polydimethylsiloxane-based root canal sealer. *JOE*, 2006; 32(12):1188-90.
11. Bystrom A., Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *IEJ*, 1985; 18(1):35-40.
12. Buchanan L. Continuous wave of condensation technique. *Endod Pract.*, 1998; 1(4):7-10, 13-6, 18.
13. Calt S., Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentine structures. *JOE*, 2002; 28(1):17-9.
14. Cameron J. The use of ultrasonics in the removal of the smear layer: a scanning electron microscope study. *JOE*, 1983; 9(7):289-92.
15. Candeiro G., Correia F., Duarte M., Ribeiro-Siqueira, D., Gavini G. Evaluation of radiopacity, pH, release of calcium ions and flow of a bioceramic root canal sealer. *JOE*, 2012; 38(6):842-5.
16. Castellucci A., Gambarini G. Otturazione canalare com il sistema Obtura: valutazioni sperimentali. *G. It. Endo*, 1992; 6:188.

17. Castellucci A. Endodontics. Il Tridente, 1ª ed, 2009; vol. I.
18. Castellucci A. Endodontics. Il Tridente, 1ª ed, 2009; vol. III.
19. Clark-Holke D., Drake D., Walton R., Rivera E., Guthmiller J. Bacterial penetration through canals of endodontically treated teeth in the presence or absence of the smear layer. J Dent, 2003; 31(4):275-81.
20. Cohen S. Caminhos da polpa. Elsevier, 9ª ed., 2007.
21. Costa A., Post L., Xavier C., Webber J., Gerhardt-Oliveira M. Marginal adaptation and microleakage of five root-end filling materials: an in vitro study. Minerva Stomatol, 2008; 57(6):295-300.
22. Crumpton B., Goodell G., McClanahan S. Effects on smear layer and debris removal with varying volumes of 17% EDTA after rotary instrumentation. JOE, 2005; 31(7): 536-8.
23. De Deus G., Endodontia. MEDSI, 5ª ed., 1992.
24. DeDeus G., Gurgel-Filho E., Ferreira C., Coutinho-Filho T. Intratubular penetration of root canal sealers. Braz Oral Res, 2002; 16(4):332-6.
25. De Deus G., Gurgel-Filho E., Ferreira C., Coutinho-Filho T. The influence of the filling technique on depth of tubular penetration of root canal sealers: scanning electron microscopy study. Brazilian Journal Oral Science, 2004b; 3(9):433-8.
26. DeDeus G., Di Giorgi K., Fidel S., Fidel K., Paciornik S. Push-out bond strength of Resilon/Epiphany and Resilon /Epiphany self-etch to root dentine. IEJ, 2009; 35(7):1048-50.
27. DeDeus G., Reis C., Di Giorgi K., Brandão M., Audi C., Fidel R. Interfacial adaptation of the Epiphany self-adhesive sealer to root dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2011; 111(3):381-385.
28. Delivanis P., Mattison G., Mendel R. The survivability of F43 strain of Streptococcus sanguis in root canals filled with gutta-percha and Procosol cement. JOE, 1983; 9(10):407-410.
29. De Moor R., De Bruyne M. The long term sealing ability of AH26 and AH plus with three gutta-percha obturation techniques. Quintessence Int., 2004; 35(4):326-31.
30. Drake D., Wiemann A., Rivera E., Walton R. Bacterial retention in canal walls in vitro: effect of smear layer. JOE, 1994; 20(2):78-82.
31. Drummond J., Sakauchi R., Racean D., Wozni J., Steinberg A. Testing mode and surface treatment effects on dentine bonding. J Biomed Mater Res, 1996; 32(4):533-41.
32. Dulac K., Tomazic T., Nielsen C., Ferrillo P., Hatton J. Comparison of the obturation of lateral canals by six techniques. JOE, 1999; 25(5):376-80.
33. Dündar M., Ozcan, M. Cömlekoglu, M., Sen B. Nanoleakage inhibition within hybrid layer using new protective chemicals and their effect on adhesion. J Dent Res, 2011; 90(1):93-8.
34. Eldeniz A., Erdemir A., Belli S. Shear bond strength of three resin based sealers to dentin with or without the smear layer. JOE, 2005; 31(4):293-6.

35. Ersev H., Yilmaz B., Dinçol M., Dağlaroğlu R. The efficacy of ProTaper Universal rotary retreatment instrumentation to remove single gutta-percha cones cemented with several endodontic sealers. *IEJ*, 2012; 45(8):756-62.
36. Floren JW., Weller RN., Pashley DH., Kimbrough WF. Changes in root surface temperatures with in vitro use of the system B HeatSource. *IEJ*, 1999; 25(9):593-5.
37. Tay FR., Loushine RJ., Monticelli F., Weller RN., Breschi L., Ferrari M., Pashley DH. Effectiveness of resin-coated gutta-percha cones and a dual-cured, hydrophilic methacrylate resin-based sealer in obturating root canals. *J Endod* 2005; 31(9):659-64.
38. Gatot A., Peist M., Mozes M. Endodontic overextension produced by injected thermoplasticized gutta-percha. *JOE*, 1989; 15(6):273-4.
39. Gençoğlu N., Samani S., Gunday M. Dentinal Wall adaptation to thermoplasticized gutta-percha in the absence or presence of smear layer: a scanning electron microscopy study. *JOE*, 1993; 19(11):558-62.
40. George JW., Michanowicz AE., Michanowicz JP., A method of canal preparation to control apical extrusion of low temperature thermoplasticized gutta-percha. *JOE*, 1987; 13(1):18-23.
41. Gharib S., Tordik P., Imamura G., Baginsky T., Goodell G. A confocal laser scanning microscope investigation of the epiphany obturation system. *JOE*, 2007; 33(8):957-61.
42. Gwinnett JA., Tay FR., Pang KM., Wei SH. Comparison of three methods of critical evaluation of microleakage along restorative interfaces. *J Prosthet Dent*, 1995; 74(6):575-85.
43. Gohneim AG., Lufty RA., Sabet NE., Fayyad DM. Resistance to fracture of roots obturated with a novel canal filling system. *JOE*, 2011, 37(11):1590-2
44. Goldman M., Simmonds S., Rush R. The usefulness of dye-penetration studies reexamined. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol*. 1989, 67(3):327-32.
45. Goodman A., Schilder H., Aldrich W. The thermomechanical properties of gutta-percha. II. The history and molecular chemistry of gutta-percha. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1974b; 37(6):954-61.
46. Goodman A., Schilder H., Aldrich W. The thermomechanical properties of gutta-percha. Part IV. A thermal profile of warm gutta-percha packing procedure. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1981; 51(5):544-51.
47. Grossman L. The effect of pH on rosin on setting time of root canal cements. *JOE*, 1982; 8(7):326-7
48. Grossman L. An improved root canal cement. *J AM Assoc*, 1958; 56(3):381-5.
49. Grossman L. Physical properties of root canal cements. *JOE*, 1976; 2(6):166-75.
50. Grossman L. The effect of pH on setting time of root canal cements. *JOE*, 1982; 8(7):326-7
51. Gutmann J.L., Adaptation of thermoplasticized gutta-percha in the absence of dentinal smear layer. *IEJ*, 1993; 26(2):87-92.

52. Haapasalo M., Ørstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res*, 1987; 66(8):1375-9.
53. Hiraishi N., Yiu CK, King NM., Tay FR. Effect of 2% chlorhexidine on dentin microtensile bond strengths and nanoleakage of luting cements. *J Dent*, 2009; 37(6):440-8.
54. Holland R., de Souza V., Nery MJ., Otoboni Filho JA., Bernabé, PF, Dezan Júnior, E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium trioxide. *JOE*, 1999; 25(3):161-6.
55. Hülsmann M., Heckendorff M., Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications of their use. *IEJ*, 2003; 36(12):810-30.
56. Ingle J. Obturation of the root canal. *Endodontics*, DC Decker, 5^a ed., 2002.
57. Koch KA., Brave, GD. A new endodontic obturation technique. *Dent Today*, 2006; 25(5):102-7.
58. Koch KA., Brave GD. Bioceramic technology- the game changer in endodontics. *Endodontic Practice*, 2009; 13-17.
59. Koch KA., Brave GD. EndoSequence: melding endodontics with restorative dentistry, part 3. *Dent Today*, 2009; 28(3):88, 90, 92.
60. Koch KA., Brave GD., Nasseh AA. Bioceramic Technology: closing the endo-restorative circle, Part I. *Dent Today*, 2010; 29(2):100-5.
61. Koch KA., Brave GD., Nasseh, AA. Bioceramic Technology: closing the endo-restorative circle, Part. 2, *Dent Today*, 2010; 29(3):98, 100, 102-5.
62. Kokkas AB., Boutsoukias ACh, Vassiliadis LP. Stavrianos CK. The influence of the smear layer on dentinal tubule penetration depth by three different root canal sealers: an in vitro study. *JOE*, 2004; 30(2):100-102.
63. Kossev D., Stefanov V. Ceramics-based sealers as new alternative to currently used endodontic sealers. *Roots*, 2009; (1):42-48.
64. Kouvas V., Liolios E., Vassiliadis L., Parissis-Messimeris S., Boutsoukias A. Influence of smear layer on depth of penetration of three endodontic sealers: an SEM study. *Endod Dent Traumatol*, 1998; 14(4):191-5
65. Kubo S., Li H., Burrow MF., Tyas MJ. Nanoleakage of dentin adhesive systems bonded to Carisolv-treated dentin. *Oper Dent*, 2002; 27(4):387-95.
66. Li H., Burrow MF., Tyas MJ. Nanoleakage pattern of four dentin bonding systems. *Dent Mater*, 2000; 16(1):48-56
67. Li H., Burrow MF., Tyas, MJ. The effect of long-term storage on nanoleakage. *Oper Dent*, 2001; 26(6):609-16.
68. Li H., Burrow MF., Tyas, MJ. The effect of thermocycling regimens on the nanoleakage of dentin bonding systems. *Dent Mater*, 2002, 18(3):189-96.

69. Li H., Burrow MF., Tyas MJ. The effect of concentration and pH of silver nitrate solution on nanoleakage. *J Adhes Dent*, 2003, 5(1):19-25.
70. Leonardo MR., Bezerra da Silva LA., Filho MT., Santana da Silva R. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 1999; 88(2):221-5.
71. Leyhausen G., Heil J., Reifferscheid G., Waldmann P., Geurtsen W. Genotoxicity and cytotoxicity of the epoxy resin-based root canal sealer AH plus. *JOE*, 1999; 25(2):109-13.
72. Lopes M. Tesis doctoral. Santiago de Compostela, 2007.
73. Loushine BA., Bryan TE., Looney SW., Gillen BM., Loushine RJ., Weller RN., Pashley DH., Tay FR. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. *JOE*, 2011; 37(5):673-7.
74. Ma J., Shen Y., Stojicic S., Haapasalo M. Biocompatibility of two novel root repair materials. *JOE*, 2011; 37(6):793-8.
75. McComb D., Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. *JOE*, 1975; 1(7):238-42.
76. Madison S., Krell KV. "Comparison of ethylenediamine tetraacetic acid and sodium hypochlorite on the apical seal of endodontically treated teeth. *JOE*, 1984; 10(10):499-503.
77. Malki M., Verhaagen B., Jiang LM., Nehme W., Naaman A., Versluis M., Wesselink P., van der Sluis L. Irrigant flow beyond the insertion depth of an ultrasonically oscillating file in straight and curved root canals: visualization and cleaning efficacy. *J Endod* 2012; 38(5):657-61.
78. Marlin J., Krakow AA., Desilets, RP Jr., Gron P. Clinical use of injection-model thermoplasticized gutta-percha for obturation of the root canal system: a preliminary report. *JOE*, 1981; 7(6):277-281.
79. Nagas E., Uyanik MO., Eymirli A., Cehreli ZC., Vallittu PK., Lassila LV., Durmaz V. Dentin moisture conditions affects the adhesion of root canal sealers. *JOE*, 2011, 38(2):240-4
80. Neelakantan P., Subbarao C., Subbarao CV., De-Deus G., Zendher M. The impact of root dentine conditioning on root sealing ability and push-out bond strength of an epoxy resin root canal sealer. *IEJ*, 2011; 44(6):491-8.
81. Nielsen BA., Beeler WJ., Vy C., Baumgartner JC. Setting times of Resilon and other sealers in aerobic and anaerobic environments. *J Endod* 2006; 32(2):130 –2.
82. Oliver CM., Abbott PV. Entrapped air and its effect on dye penetration of voids. *Endodontics and Dental Traumatology*, 1991, 7(8):135-8.
83. Ørstavik D., Mjör IA. Histopathology and x-ray microanalysis of the subcutaneous tissue response to endodontic sealers. *JOE*, 1988; 14(1):13-23.
84. Ørstavik D., Haapasalo M. Desinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endodon Dent Traumatol*, 1990; 6(4):142-9.

85. Ørstavik D., Nordahl I., Tibballs JE. Dimensional change following setting of root canal sealer materials. *Dent Mater*, 2001; 17(6):512-9.
86. Pallarés A., Faus V., Glickman GN. The adaptation of mechanically softened gutta-percha to the canal walls in the presence or absence of smear layer: a scanning electron microscopy study. *IEJ*, 1995; 28(5):266-269.
87. Paragliola R., Franco V., Fabiani C., Mazzoni A., Nato F., Tay FR., Breschi L., Grandini S. Final rinse optimization: influence of different agitation protocols. *Joe*, 2010; 36(29):282–5.
88. Parente JM., Loushine RJ., Susin L., Gu L., Looney SW., Weller RN., Pashley DH., Tay FR. Root canal debridement using manual dynamic agitation or the EndoVac for final irrigation in a closed system and an open system. *IEJ* 2010; 43(11):1001–12.
89. Pascon EA., Spångberg LS. In vitro cytotoxicity of root canal filling materials: 1. Gutta-percha. *JOE*; 1990, 16(9):429-33.
90. Pashley DH. Smear layer: physiological considerations. *Oper Dent Suppl*, 1984;3:13-29.
91. Pashley, DH. Smear layer: overview structure and function. *Proc Finn Dent Soc*, 1992; 88 Suppl 1; 215-24
92. Perdigão J., Lambrechts P., Van Meerbeek B., Vanherle G., Lopes AL. Field emission SEM comparison of four postfixation drying techniques for human dentin. *J Biomed Mater Res*. 1995; 29(9):1111-20
93. Roggendorf MJ., Legner M., Ebert J., Fillery E., Frankenberger R., Friedman S. Micro-CT evaluation of residual material in canals filled with Activ GP or GuttaFlow following removal with NiTi instruments. *IEJ*, 2010; 43(3):200-9.
94. Santos, V, Tese de Mestrado Integrado, ISCSEM, 2008.
95. Sano H., Shono T., Takatsu T., Hosoda H. “Microporous dentin zone beneath resin-impregnated layer. *Oper Dent*, 1994; 19(2):59-64.
96. Sano H., Takatsu T., Ciucchi B., Horner JA., Mathews WG., Pashley DH. Nanoleakage: leakage within the hybrid layer. *Operat Dent*, 1995a; 20(1):18-25.
97. Sano H., Yoshiyama M., Ebisu S., Burrow MF., Takatsu T., Ciucchi B., Carvalho R., Pashley DH. Comparative SEM and TEM observations of nanoleakage within the hybrid layer. *Operat Dent*, 1995; 20(4):160-7.
98. Saunders WP., Saunders EM. Influence of smear layer on the coronal leakage of Thermafil and laterally condensed gutta-percha root fillings with a glass ionomer sealer. *JOE*, 1994; 20(4):155-8.
99. Schäfer E., Zandbigliari T. Solubility of root canal sealers in water and artificial saliva. *IEJ*, 2003; 36(10):660-9.
100. Schilder H. Filling the canal in three dimensions. *Dent Clin North Am*, 1967; 723-44.
101. Schilder H., Goodman A., Aldrich W. The thermomechanical properties of gutta-percha. I. The compressibility of gutta-percha. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1974; 37(6):946-53.

102. Schilder H., Goodman A., Aldrich W. The thermomechanical properties of gutta-percha. Part V. Volume changes in bulk gutta-percha as a function of temperature and its relationship to molecular phase transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1985; 59(3):285-96.
103. Sen BH., Safavi KE., Spångberg LS. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorohexidine in root canals. *JOE*, 1999; 25(4):235-8.
104. Sagsen B., Ustün Y., Demirbuga S., Pala K. Push-out bond strength of two new calcium silicate-based endodontic sealers to root canal dentine. *IEJ*, 2011; 44(12):1088-91.
105. Shokouhinejad N., Gorjestani H., Nasseh AA., Hoseini A., Mohammadi M., Shamshiri AR. Push-out bond strength of gutta-percha with a new bioceramic sealer in the presence or absence of smear layer. *Aust Endod J*, 2013; 39(3):102-6.
106. Silva EJ., Rosa TP., Herrera DR., Jacinto RC., Gomes B., Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *JOE*, 2013; 39(2):274-7.
107. Siqueira JF Jr., Favieri A., Gahyva SM., Moraes SR., Lima KC., Lopes HP. Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. *JOE*, 2000, 26 (5):274-7.
108. Skinner RL., Himel VT. The sealing ability of injection–molded thermoplasticized gutta-percha with and without the use of sealers. *JOE*; 1987; 13(7):315-7.
109. Spångberg LS., Acierno TG., Yongbum Cha B. Influence of entrapped air on the accuracy of leakage studies using dye penetration methods. *JOE*, 1989; 15(11):548-51.
110. Spångberg LS., Barbosa SV, Lavigne GD. AH 26 releases formaldehyde. *JOE*, 1993; 19(12):596-8.
111. Spångberg LS., Acierno TG., Yongbum Cha B. Influence of entrapped air on the accuracy of leakage studies using dye penetration methods. *JOE*, 1989; 15(11):548-51.
112. Tani-Ishii N., Teranaka T. Clinical and radiographic evaluation of root canal obturation with obtura II. *JOE*, 2003; 29(11):739-742.
113. Tay FR., Pashley DH., Yoshiyama M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. *J Dent Res*, 2002; 81(7):472-6.
114. Tay FR., Loushine RJ., Weller RN., Kimbrough WF., Pashley DH., Mak YF., Lai CN., Raina R., Williams MC. Ultrastructural evaluation of the apical seal in roots filled with a polycaprolactone-based root canal filling material. *JOE*, 2005; 31(7):514-9
115. Tay FR., Pashley DH. Monoblocks in root canals: a hypothetical or tangible goal. *JOE*, 2007; 33(4):391-8.
116. van der Sluis LW., Gambarini G., Wu MK., Wesselink PR. The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation. *IEJ*, 2006; 39(6): 472–6.
117. van der Sluis LW., Shemesh H., Wu MK., Wesselink PR. An evaluation of the influence of passive ultrasonic irrigation on the seal of root canal fillings. *IEJ*, 2007; 40(5):356–61.

118. van der Sluis LW., Wu MK., Wesselink P. Comparison of 2 flushing methods used during passive ultrasonic irrigation of the root canal. *Quintessence Int*, 2009; 40(10): 875-9.
119. Mozo S., Llena C., Forner L. Review of ultrasonic irrigation in endodontics: increasing action of irrigating solutions. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal*, 2012; 17(3):512-6.
120. Vera J., Arias A., Romero M. Effect of maintaining apical patency on irrigant penetration into the apical third of root canals when using passive ultrasonic irrigation: an in vivo study. *J Endod* 2011; 37(9):1276-8.
121. Versiani MA., Carvalho-Junior JR., Padilha MI., Lacey S., Pascon EA., Sousa-Neto MD. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus and Epiphany root canal sealants. *IEJ*, 2006; 39(6):464-71.
122. Weller RN., Kimbrough WF., Anderson RW. A comparison of thermoplastic obturation techniques: adaptation to the canal walls. *JOE*, 1997; 23(11):703-6.
123. Willershausen I., Callaway A., Briseño B., Willershausen B. In vitro analysis of the cytotoxicity and the antimicrobial effect of four endodontic sealers. *Head Face Med*, 2011; 7:15.
124. Wu W., Cobb E., Dermann K., Rupp NW. Detecting margin leakage of dental composite restorations. *J Biomed Mater Res*, 1983; 17(1):37-43.
125. Yared GM., Bou Dagher F. Sealing ability of the vertical condensation with different root canal sealers. *JOE*, 1996, 22(1):6-8.
126. Youngson CC., Jones JC., Manogue M., Smith IS. In vitro penetration by tracers used in microleakage studies. *IEJ*, 1998, 31(2):90-9.
127. Zehnder M., Kosicki D., Luder H., Sener B., Waltimo T. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodon*, 2002; 94(6):756-62.
128. Zehnder M. Root canal irrigants. *JOE*, 2006; 32(5):389-98.
129. Zemner O., Spielberg C., Lamberghini F., Rucci M. Sealing properties of a new epoxy resin-based root canal sealer. *IEJ*, 1997; 30(5):332-4.
130. Zhang H., Shen Y., Ruse ND., Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *JOE*, 2009; 35(7):1051-5.
131. Zhang W., Li Z., Peng B. Assessment of a new root canal sealer's apical sealing ability. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2009, 107(6):e79-82.
132. Zhang W., Li Z. Ex vivo cytotoxicity of a new calcium silicate-based canal filling material. *IEJ*, 2010; 43(9):769-74.
133. Zoufan K., Jiang J., Komabayashi T., Wang YH., Safavi KE., Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of Gutta Flow and Endo Sequence BC sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Endod*, 2011; 112(5):657-61.

